

**DISEÑO Y FABRICACIÓN DE *SCAFFOLDS* EN NYLON PARA CRECIMIENTO
CELULAR USANDO TECNOLOGÍAS DE SINTERIZACIÓN LÁSER**

JUAN SEBASTIAN GIRALDO SAAVEDRA

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE OCCIDENTE
FACULTAD DE INGENIERIA
DEPARTAMENTO DE AUTOMATICA Y ELECTRONICA
PROGRAMA DE INGENIERIA BIOMEDICA
SANTIAGO DE CALI
2014**

**DISEÑO Y FABRICACIÓN DE *SCAFFOLDS* EN NYLON PARA CRECIMIENTO
CELULAR USANDO TECNOLOGÍAS DE SINTERIZACIÓN LÁSER**

JUAN SEBASTIAN GIRALDO SAAVEDRA

**Pasantía En Investigación Para Optar Por El Titulo De
Ingeniero Biomédico**

Directora:

DRA. CLARA EUGENIA GOYES LÓPEZ

Doctora En Ingeniería Con Énfasis En Ingeniería De Materiales

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE OCCIDENTE
FACULTAD DE INGENIERIA
DEPARTAMENTO DE AUTOMATICA Y ELECTRONICA
PROGRAMA DE INGENIERIA BIOMEDICA
SANTIAGO DE CALI
2014**

Nota de aceptación:

Aprobado por el Comité de Grado en cumplimiento de los requisitos exigidos por la Universidad Autónoma de Occidente para optar al título de Ingeniero Biomédico.

PAOLA ANDREA NEUTA

Jurado

CLARA EUGENIA GOYES

Director

Santiago de Cali, 11 de Junio de 2014

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas las personas que hicieron posible la realización de este proyecto. Principalmente a Clara Eugenia Goyes, director de esta tesis y directora del grupo de investigación IMAMNT de quien recibí un gran apoyo en todas las etapas del proyecto.

En segunda instancia a Sylvana Garcia-Rodriguez, Alejandro Roldan-Alzate, Tim Osswald, quienes me recibieron en la Universidad de Madison Wisconsin, donde se realizó gran parte del desarrollo de este proyecto.

A la profesora Luz Elena Vinasco Isaza quien fue de gran ayuda en el procesamiento estadístico de toda la información obtenida en las diferentes etapas del proyecto.

A Paola Andrea Neuta quien desde su posición como profesora y directora de programa de Ingeniería Biomédica fue de gran apoyo para el desarrollo de este proyecto.

Finalmente a todos los asistentes de los diferentes laboratorios de la Universidad Autónoma de Occidente, pues en cada una de las pruebas ellos facilitaron el trabajo.

CONTENIDO

	Pag.
GLOSARIO	11
RESUMEN	14
INTRODUCCIÓN	16
1. PRELIMINARES	18
1.1. ESTADO DEL ARTE	18
2. PROBLEMA DE INVESTIGACION	21
2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. OBJETIVOS	26
4.1. OBJETIVO GENERAL	26
4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	26
5. MARCO REFERENCIAL	27
5.1 MARCO TEORICO	27
5.1.1 Biomateriales	27
5.1.2 El Hueso	28
5.1.3 Polímeros	29
5.1.4 Nylon	29
5.1.5 Método De Sinterización Láser	30
5.1.6 Propiedades Mecánicas Del Hueso	34
5.1.7 Tamaño De Poro	37
5.1.8 Mecanismos De Reparación De Defectos Óseos	38
5.1.9 Células Y Cultivos Celulares	39
5.1.10 Método De Esterilización	42

6	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	44
6.1	DISEÑO DE SCAFFOLDS UTILIZANDO HERRAMIENTAS COMPUTACIONALES	44
6.2	OBTENCION DE SCAFFOLDS CON DIFERENTES PARAMETROS DE FABRICACIÓN	45
6.3	PRUEBAS MECÁNICAS	48
6.4	CULTIVOS CELULARES Y EVALUACIÓN DE PROLIFERACIÓN CELULAR	49
7	RESULTADOS Y ANALISIS	52
7.1	ETAPA DE DISEÑO	52
7.2	ETAPA DE FABRICACIÓN	53
7.3.	CARACTERIZACIÓN MECÁNICA	59
7.4	CULTIVOS CELULARES Y PRUEBAS DE PROLIFERACIÓN CELULAR	75
8	CONCLUSIONES	80
9	RECOMENDACIONES	81
	BIBLIOGRAFIA	82

LISTA DE TABLAS

	Pag.
Cuadro 1. Propiedades de hueso trabecular en mujeres jóvenes vs mujeres adultas	36
Tabla 2. Características de fabricación de muestras utilizadas en el primer barrido	45
Tabla 3. Características de fabricación muestras utilizadas en la caracterización mecánica sin poros	48
Tabla 4. Características de muestras con poros utilizadas en pruebas mecánicas	48
Tabla 5. Datos consignados de tamaño de poro 400 μm y SS=0,18 mm	53
Tabla 6. Datos consignados de tamaño de poro 400 μm y SS=0,19 mm	54
Tabla 7. Analisis ANOVA de datos consignados para 400 μm	54
Tabla 8. Datos consignados tamaño de poro 500 μm con 0,18 mm	55
Tabla 9. Datos consignados tamaño de poro 500 μm con 0,19 mm	55
Tabla 10. Análisis ANOVA de datos consignados para 500 μm	55
Tabla 11. Análisis ANOVA 400 μm entre ED y tamaño de poro	56
Tabla 12. Análisis ANOVA 500 μm entre ED y tamaño de poro	56

Tabla 13. Ajuste lineal realizado sobre gráfica de esfuerzo deformación	60
Tabla 14. Resultados para límite elástico y modulo elástico según los parámetros de fabricación	61
Tabla 15. Datos introducidos a Minitab	63
Tabla 16. Análisis de varianza para Modulo Elástico, usando Adjusted SS para Tests	64
Tabla 17. Análisis ANOVA para límite elástico	68
Tabla 18. Datos obtenidos para pruebas mecánicas con $L_p=11W$ y $SS=0,19$ mm	73
Tabla 19. Concentraciones utilizadas para curva de calibración	77
Tabla 20. Tabla de promedios de absorbancia de células en scaffold	77

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Diagrama equipo de sinterización láser	31
Figura 2. Energía suministrada por el láser al material	33
Figura 3. Comportamiento mecánico de un material	34
Figura 4. Imagen histológica de la recuperación de tejido óseo	38
Figura 5 Diferenciación de células madre mesenquimales.	40
Figura 6 Equipo DTM Sinterstation 2500 utilizado para la fabricación de los scaffolds	47
Figura 7 Maquina universal de ensayos Instron, laboratorio de materiales UAO	49
Figura 8 400 μm poro cuadrado 70%.	52
Figura 9 500 μm poro circular 70%	52
Figura 10 700 μm poro cuadrado 70%	52
Figura 11 Burbuja en scaffold fabricado con Lp de 7 W	58
Figura 12 Estructura interna de material sinterizado	58
Figura 13 Izquierda poro cuadrado con forma circular, derecha poro circular amorfo	59
Figura 14 Gráfica 1, esfuerzo deformación para ensayo de compresión muestra 1, parámetros Lp 9, SS 0.18	60
Figura 15 Gráfica 2, Esfuerzo vs Deformación de todas las combinaciones de parámetros realizadas	63
Figura 16 Gráfica 3 Interacción del módulo elástico	65

Figura 17 Gráfica 4 Supuesto de normalidad	66
Figura 18 Gráfica 5, Supuesto de varianza, aleatoriedad e independencia	67
Figura 19, Gráfica 6, Contorno módulo elástico	67
Figura 20 Gráfica 7, Superficie modulo elástico	68
Figura 21, Gráfica 8, Interacción límite elástico	70
Figura 22, Gráfica 10, Distribución de límite elástico	71
Figura 23, Gráfica 9, Validación supuesto de varianza	71
Figura 24, Gráfica 11, Relación módulo elástico y límite elástico	72
Figura 25 Gráfica 12, Generada en Excel a partir de datos obtenidos en pruebas mecánicas de compresión para módulo elástico	74
Figura 26, Gráfica 13, Generada en Excel a partir de datos obtenidos en pruebas mecánicas de compresión para límite elástico	74
Figura 27 Imágenes de los poros superficiales de los scaffolds fabricados para cultivos celulares	76
Figura 28 Scaffolds fabricados para cultivos celulares	76
Figura 29, Gráfica 14, Curva de calibración	78
Figura 30 Fotos tomadas con microscopio de un scaffold de 600 μm, embebidos en el cultivo celular, avance en el tiempo	79

GLOSARIO

ABSORBANCIA: es la cantidad de luz que un cuerpo absorbe cuando es incidido por un haz de luz.

BIOMATERIAL: es un material que sirve como estructura, o parte funcional, de un dispositivo médico implantable.

CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES: son células pluripotenciales que tienen la posibilidad de generar una amplia variedad de tejidos, entre los que se encuentran tejido conectivo, hueso, cartílago, tendón, ligamento, estroma medular, adipocitos, dermis y células musculares.

DEFORMACIÓN ELÁSTICA: es una categoría de caracterización de un material donde al aplicar una carga y luego retirarla el material recupera su forma original y no presenta deformaciones en el resultado final.

DEFORMACIÓN PLÁSTICA: es una categoría de caracterización de un material donde al aplicar una carga se genera una deformación que al retirar la carga permanece presente.

DENSIDAD DE ENERGÍA (ED): es la energía que es proporcionada por el láser por milímetro cuadrado al impactar el material pulverizado.

DENSITOMETRÍA ÓPTICA: método para identificar el grado de oscuridad de un material semitransparente o de una superficie reflectante.

DIMETILSULFÓXIDO (DMSO): compuesto utilizado para proteger a las células de los cristales que se forman en el proceso de congelación y descongelación.

DMEM: es una solución que contiene sales, aminoácidos y vitaminas que el permiten a la célula realizar los procesos metabólicos para mantenerse viva.

FORMAZAN: compuesto de color azul. Es obtenido a partir de la reducción del MTT y es utilizado en las pruebas con células para identificar la cantidad de células vivas por medio de densitometría óptica.

INGENIERÍA DE TEJIDOS: es la aplicación de principios y métodos de ingeniería para el entendimiento de estructuras funcionales y el desarrollo de sustitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar tejidos y sus funciones.

LÍMITE ELÁSTICO: indica la máxima carga que puede soportar el material sin perder su estructura, el momento donde la deformación de un material pasa de ser plástica a elástica.

MÓDULO ELÁSTICO: indica la resistencia a la deformación de un material.

MTT: [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] un compuesto que sirve para identificar por medio de reacciones químicas si una célula está viva o no.

PBS: solución acuosa que sirve para reemplazar el líquido extracelular que contiene los componentes necesarios para mantener viva una célula.

POTENCIA DEL LÁSER (L_p): es la potencia con la que el láser impacta el material pulverizado en el proceso de sinterización láser.

PROLIFERACIÓN CELULAR: es el incremento del número de células por división celular.

SCAFFOLD: son estructuras tridimensionales que sirven como base para la proliferación celular. La traducción de la palabra *scaffold* es andamio, pero en español se conoce como matriz.

SCAN SPACING (SS): es la separación de barrido con la que pasa el láser sobre el material pulverizado en el proceso de sinterización láser.

SINTERIZADO LÁSER: es un método de prototipado rápido que utiliza la manufactura aditiva para la construcción de estructuras sólidas con diferentes materiales.

SUERO BOVINO FETAL (SBF): es una solución utilizada en los medios de cultivo para proporcionar el medio adecuado para la supervivencia de las células.

RESUMEN

La Ingeniería de Tejidos se centra en restablecer los tejidos del cuerpo humano y sus funciones. Uno de los tejidos sobre los que se han realizado un gran número de investigaciones es el tejido óseo, este tejido posee diferentes estructuras según su ubicación anatómica, pero todas estas con la funcionalidad de brindar soporte a la estructura muscular y protección a las estructuras vitales. Estas estructuras óseas al igual que todas las estructuras del cuerpo poseen mecanismos de reparación propios, pero existen casos en los que los defectos son de grandes tamaños y no se pueden recuperar de manera natural, a estos se les conocen como defectos críticos¹.

Para la recuperación de defectos óseos críticos se han utilizado diferentes tipos de implantes y diferentes materiales como hueso autólogo, hueso obtenido del mismo paciente, diferentes metales biocompatibles y en los últimos años se ha investigado en el uso de polímeros biocompatibles. En este proyecto se pretende utilizar la tecnología de Sinterización Láser Selectiva (Selective Laser Sintering, o SLS) para la fabricación de una matriz en nylon en la cual se logre evaluar como la microestructura afecta tanto sus propiedades mecánicas como la interacción con tejidos biológicos, en este caso células madre.

Este proyecto se realizó en una cooperación con el Polymer Engineering Center de la Wisconsin University en EEUU, en donde se cuenta con el servicio de SLS en una maquina Sinter Station 2000 en la cual se realizó la fabricación de las matrices. Para el diseño de estas se realizó en el software SolidWorks®. Se realizó un barrido de las diferentes propiedades de SLS para lograr las mejores porosidades en la fabricación de las matrices, se logró obtener matrices con poros entre 400 μm y 700 μm con diferentes parámetros de fabricación. Luego, en el laboratorio de materiales de la Universidad Autónoma de Occidente, Maquina de ensayos Universales marca Instron, se realizaron pruebas de compresión para evaluar las propiedades mecánicas por medio del límite elástico, realizando pruebas con diferentes propiedades de fabricación para un solo tamaño de poro.

¹ DUQUE DE MIRANDA CHAVES NETTO ; ; ;

Luego, para la evaluación de la viabilidad celular de las matrices con diferentes tamaños de poro, se realizó una estandarización para saber, según el tamaño de las matrices, la concentración celular ideal a utilizar. Teniendo identificada esta concentración se pasó a realizar los cultivos en las matrices con poros de 500 μm y 600 μm , debido a que los poros de 400 μm no permitieron limpiar por completo el interior de la matriz, lo que generaría un sesgo en los resultados, mientras que los poros de 700 μm presentaron muy baja resistencia mecánica a la compresión por lo que se aislaron de continuar en el estudio.

Los resultados encontrados en el desarrollo de este proyecto, pretenden que por medio del control de los parámetros de fabricación, se logre un control de la microestructura. Además permite tener certeza de las propiedades mecánicas de la matriz, y así optimizar la proliferación celular según sea la aplicación indicada.

Palabras clave: Ingeniería de Tejidos, Ingeniería de Materiales, Matrices extracelulares, Proliferación celular, Sinterización láser, Nylon, Células madre mesenquimales.

INTRODUCCIÓN

En el campo de la Ingeniería biomédica existen muchos avances científicos y tecnológicos hacia el diseño de dispositivos que permiten restablecer las funciones disminuidas o perdidas en personas en situación de discapacidad. Esta parte de la Ingeniería biomédica es conocida como Ingeniería de rehabilitación y abarca desde el diseño de prótesis, órtesis, hasta soluciones a nivel celular.

En este proyecto de grado, el cual hace parte de un desarrollo del grupo de investigación IMAMNT, se pretendía comprobar si una de las técnicas más modernas de prototipado rápido, conocida como Sinterización láser, puede ser usada para el diseño de dispositivos que podrían complementar o ser parte del campo de la Ingeniería de Tejidos. Como trabajo de grado de un ingeniero biomédico, esta propuesta permitirá la identificación de tecnologías que sean útiles para el diseño y fabricación de dispositivos para restablecimiento de tejidos y sus funciones.

La propuesta está enmarcada en la línea de investigación de biomateriales que busca soluciones, desde la ingeniería biomédica y la ingeniería de materiales, a problemas relacionados con la regeneración de tejidos. Sin embargo, como parte de un macroproyecto, esta propuesta apunta hacia la regeneración de tejido óseo específicamente. En este sentido, se trata de usar la tecnología de sinterización láser para fabricar estructuras tridimensionales, conocidas como *scaffolds*, a partir de poliamida 12 (Nylon). Como se fabricó de un dispositivo que da lugar a la regeneración de tejidos, es decir que se pueda proyectar a soluciones a nivel celular, estas estructuras se llevaron a un laboratorio con el fin de identificar cómo se comporta la proliferación celular, y como varía está según los parámetros de fabricación del *scaffold*.

Las células que se utilizaron fueron células madre mesenquimales. La elección se realizó teniendo en cuenta que estas células tienen la capacidad de presentar división celular en células de la misma naturaleza, o transformarse en células diferenciadas con funciones específicas. Lo anterior permitirá que el material sea utilizado en aplicaciones donde sea necesaria la regeneración de tejidos, en este caso para la recuperación de tejido óseo.

De acuerdo con la metodología planificada, se realizaron diferentes prototipos, en los cuales había una variación en su diseño, forma del poro, tamaño del poro y

cantidad de poros, y manteniendo el tamaño de la probeta, con el fin de estudiar la proliferación de las células madre en cada uno de ellos. El aporte finalmente está dirigido a conocer la viabilidad de esta tecnología de fabricación para la obtención de *scaffolds* de naturaleza polimérica y la relación entre control del diseño del *scaffold* y la proliferación de células madre asociada al mismo.

1. PRELIMINARES

1.1. ESTADO DEL ARTE

Conocer las propiedades físicas y químicas del material con el que se va a trabajar es muy importante para la Ingeniería de tejidos. Esta última, es la aplicación de principios y métodos de ingeniería para el entendimiento de estructuras funcionales y el desarrollo de sustitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar tejidos y sus funciones². Dentro del campo de la Ingeniería de tejidos uno de los conceptos más importantes es el de *scaffolds* que son estructuras tridimensionales que sirven como base para la proliferación celular.

Estas estructuras se pueden componer de materiales biológicos como carbohidratos, proteínas, péptidos y ácidos nucleicos. También de materiales sintéticos como polímeros o materiales inorgánicos, inclusive de tejido procesado proveniente de humanos o animales. La selección del material, el diseño, y la fabricación contribuyen a definir los parámetros del *scaffold*. Entre los parámetros que permiten el uso de algunos materiales son biocompatibilidad, propiedades mecánicas, propiedades físicas, absorción, degradabilidad y la esterilidad del material³.

La ingeniería de tejidos puede ser aplicada a diferentes tejidos en el cuerpo humano, en búsqueda que sea en todos. En casos como oftalmología, la regeneración de retina, es presentada por algunos autores en investigaciones dirigidas al entendimiento de la regeneración de la misma⁴, la cual se da de forma natural para algunos animales, ningún mamífero desafortunadamente. Otras investigaciones muestran que se están llevando a cabo experimentos con el fin de poder mimetizar estas muestras de la naturaleza al ser humano. Entre los resultados ya se ha logrado llevar diferentes tipos de células a diferenciarse en células de la retina y se ha identificado la forma en la que estas reemplazan el tejido dañado⁵.

² LEE Mark H., ARCIDIACONO Judith A., BILEK Anastacia M., WILLE Jeremiah J., HAMILL Caitilin A., WONNACOTT Keith M., WELLS Martha A., OH Steven S., (2009). Considerations for Tissue-Engineered and Regenerative Medicine Product Development Prior to Clinical Trials in the United States. **TISSUE ENGINEERING**. 00 (B)

³Ibid.

⁴ TSONISA Panagiotis A., RIO-TSONIS Katia Del, (2004). Lens and retina regeneration: Transdifferentiation, stem cells and clinical applications. **Experimental Eye Research**. 78 , pp.161–172.

⁵Ibid.

Uno de los campos en los que se han utilizado los *scaffolds* para la regeneración de tejidos es la regeneración de cartilago en lesiones de rodilla⁶ en el cual se utiliza colágeno como una matriz y en esta se realiza un cultivo de células madre. En los resultados de este estudio se muestra que se utilizaron diferentes estructuras para la matriz y diferentes tipos de células encontrando, en pruebas *in vitro*, que la estructura de la matriz influye en la proliferación, y que las células madre son las que mejores resultados presentan en la regeneración del tejido⁷.

Otra aplicación encontrada para los *scaffolds* en ingeniería de tejidos se encontró en tejido muscular en la cual se presentan los resultados de una investigación realizada para regeneración de musculo cardiaco. En este estudio se utiliza el método de sinterizado láser para la construcción de *scaffolds* de polycaprolactona, en los cuales se alojaron mioblastos y en cultivos *in vitro* y se identificó la proliferación de estas. En los resultados que arrojó esta investigación se muestra la ventaja de la técnica de sinterizado láser en el control de la porosidad de los *scaffolds*, y la efectiva proliferación celular de mioblastos en esta matriz⁸.

La aplicación de los *scaffolds* para un tejido u otro hace que se varíen las propiedades del *scaffold* en cuanto a sus propiedades mecánicas y el tamaño de sus poros. Para la regeneración de tejido óseo que es lo que nos concierne en este proyecto, se encontraron diferentes estudios en los cuales no se logra establecer un tamaño de poro específico u óptimo. En una serie de artículos que se encuentran resumidos en uno solo⁹, se presentan resultados de diferentes investigaciones usando diferentes tamaños de poros para la regeneración de hueso, encontrando entre estos que hay regeneración del tejido desde 150 μm hasta 600 μm concluyendo que es tan importante la interconectividad de los poros como el tamaño de los poros¹⁰.

En cuanto a las propiedades mecánicas del hueso, se encontró que la mayoría de las investigaciones que se encontraban estaban enfocadas en hueso animal,

⁶ PABBRUWE Moreica B., KAFIENAH Wael, TARLTON John F., MISTRY Sanjay, FOX Dennis J., HOLLANDER Anthony P.; "Repair of meniscal cartilage white zone tears using a stem cell/collagen-
" 31 1 5 83-2591.

⁷ *Ibid.*

⁸ YEONG W.Y., SUDARMADJI N., YU H.Y., CHUA C.K., LEONG K.F., VENKATRAMAN S.S., BOEY Y.C.F., TAN L.P.; "*Porous polycaprolactone scaffold for cardiac tissue engineering fabricated by selective laser sintering*" en *Acta Biomaterialia* 6 (2010) 2028-2034.

⁹ HENNERKUHNE Jobst, BART Rainer, FRISCH Bertha, HAMME Claus, JANSSON Volkmar, ZIMMER Markus, (1994). Bone formation in coralline hydroxyapatite. *Acta Orthop Scand.* 65 (3), pp.246 - 252.

¹⁰ *Ibid.*

bovino principalmente, y muy pocas realizadas sobre hueso humano. La principal que se tomó como referencia para este proyecto fue un artículo titulado *Age-related deterioration in trabecular bone mechanical properties at material level: Nanoindentation study of the femoral neck in women by using AFM*¹¹ en el cual se realizó un estudio en cadáveres de mujeres de diferentes edades, para tener datos comparativos de la resistencia del hueso a compresión y la influencia de la edad en esta.

En la Figura 4, tomada de este mismo artículo¹², se presentan los resultados más importantes para referenciar en este proyecto, en este se puede ver el módulo elástico, el cual es la pendiente de la gráfica e indica la resistencia a la deformación. Vemos de este que tiene un valor de 1.28 GPa en la cabeza del fémur de los cadáveres de las mujeres jóvenes, rango de edad alrededor los 32 años y 1.97 GPa en mujeres de edad avanzada, alrededor de los 88 años¹³.

Estos resultados indican que a mayor edad, se encuentra una mayor resistencia del material a la deformación, la explicación presentada en el artículo se basa en que a medida que se avanza en la edad, la composición mineral del hueso cambia, encontrando granos más grandes, lo cual genera que la absorción de energía sea menor, generando mayor rigidez en el hueso. Sería ideal continuar una investigación similar identificando el límite elástico y la tenacidad, para completar la caracterización mecánica y presentar los diferentes comportamientos del hueso con el avance de la edad.

De esta manera se puede ver que en la Ingeniería de rehabilitación, de la mano con la Ingeniería de tejidos, se están realizando investigaciones en el desarrollo de nuevas técnicas para la producción de *scaffolds*. Hasta ahora se han encontrado resultados muy alentadores en las pruebas *in-vitro* pero en el ambiente *in-vivo* se encuentran grandes diferencias, de manera que las investigaciones apuntan a mejorar la mimetización de estas matrices extracelulares con las estructuras reales de los tejidos.

¹¹ MILOVANOVIC Petar, POTOČNIK POTOČNIK Jelena, DJONIC Danijela, NIKOLIC Slobodan, ZIVKOVIC Vladimir, DJURIC Marija, RAKOČEVIC Zlatko, (2012). Age-related deterioration in trabecular bone mechanical properties at material level: Nanoindentation study of the femoral neck in women by using AFM. *Experimental Gerontology*. 47, pp.154 – 159.

¹² Ibid.

¹³ Ibid.

2. PROBLEMA DE INVESTIGACION

2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De acuerdo con varios estudios que realiza el Grupo investigación IMAMNT, se ha previsto que muchas aplicaciones médicas requieren que los implantes se mantengan como estructuras sólidas porosas. Estas estructuras son conocidas como *scaffolds*, las cuales hoy en día son usadas como implantes de Ingeniería de tejidos; dichas estructuras pueden ser diseñadas para que cumplan una función como matriz que permita albergar cultivos celulares o medicamentos. La porosidad en un *scaffold* puede ser controlada de acuerdo con el proceso de fabricación.

Una de las técnicas más modernas de prototipado rápido es conocida como Sinterización láser, la cual es una técnica de manufactura aditiva que actualmente se está usando para la fabricación de estructuras tridimensionales con resultados interesantes en cuanto al control de la porosidad, el tamaño y la forma. El proceso de sinterización láser es un proceso de prototipado rápido en el cual, un objeto en 3D se fabrica a partir de un material en polvo que luego, con la interacción del material con un láser, cambia su estado físico y se consolida con la forma deseada. En este sentido, se pueden obtener piezas directamente con la forma que se requiere, evitando el uso de tecnología de mecanizado posterior.

En la literatura se ha encontrado que la presencia de una matriz ósea en el defecto acelera la regeneración del hueso¹⁴ sumado a esto, en otros estudios también se establece que la presencia de células mesenquimales en la matriz implantada genera un estímulo que acelera aún más el proceso de recuperación del hueso¹⁵. De manera que al diseñar una matriz que permite albergar células y estimule su crecimiento y proliferación acelerará los procesos de recuperación de pacientes en situación de discapacidad debido a una lesión con defecto crítico.

¹⁴ Ibid.

¹⁵ SALDAÑA DÍAZ Andrés, (2010). *TESIS: Efecto de la Implantación de Células Mesenquimales de Tejido Adiposo Diferenciadas a Osteoblastos en la Reparación de Fémur en un Modelo Experimental Ovino*. León, España: Departamento de Medicina, Cirugía y Anatomía Veterinaria, Universidad de León.

Conociendo el uso del Nylon como un posible material para el desarrollo de la Ingeniería de Tejidos, siendo utilizado para cumplir funciones en cultivos celulares y como estructura de soporte gracias a sus características físicas; conociendo las ventajas del proceso de *sinterizacion laser* y los parámetros de fabricación que requiere este; se plantea de esta manera la pregunta de investigación de este proyecto ¿cómo es la proliferación de células madre mesenquimales en diferentes *scaffolds* de Nylon, obtenidos usando tecnología de sinterización láser?

3. JUSTIFICACIÓN

La Ingeniería de Rehabilitación consiste en el mejoramiento de la calidad de vida de las personas en situación de discapacidad, esta abarca desde prótesis, órtesis, hasta soluciones a nivel celular. Dentro de este campo, la Ingeniería de Tejidos está tomando un lugar de gran importancia en la rehabilitación de tejidos funcionales. Se encuentran muchos artículos de investigación en los cuales se está utilizando la ingeniería de tejidos para la regeneración tisular, lo que permite que se realice la recuperación de un tejido compuesto por células y no materiales artificiales^{16,17,18}, en diferentes áreas del cuerpo.

Una de las áreas en las que se está trabajando es el tejido óseo, el cual presenta una regeneración más lenta que el resto de los tejidos del cuerpo, además de esto presenta, al igual que todos los tejidos, un tamaño crítico de defecto, de manera que defectos de gran tamaño no se regeneran por su cuenta¹⁹ es por esto que se requiere desarrollar un mecanismo que asista dicho proceso de recuperación.

Otra característica importante y para tener en cuenta en el desarrollo del proyecto es la relación existente entre las propiedades mecánicas del hueso y la edad de las personas, pues en la literatura se encuentra que en diferentes edades el comportamiento mecánico del hueso es diferente, por ejemplo se encontró que a mayor edad se encuentran estructuras minerales con mayor tamaño de grano en el hueso, lo que genera variaciones mecánicas, entre ellas disminución en la elasticidad del hueso²⁰. Esto último genera que la disipación de energía sea menor y mayor el riesgo de fracturas. Es importante tener en cuenta la microestructura en la fabricación de *scaffolds* pues es cambiando esta que se generan cambios en el comportamiento mecánico del implante, permitiendo realizar trabajos acordes a la edad de la persona y a la aplicación deseada.

¹⁶ Porous ceramic titanium dioxide scaffolds promote bone formation in rabbit peri-implant cortical defect model Op. Cit.

¹⁷ Repair of meniscal cartilage white zone tears using a stem cell/collagen-scaffold implant Op. Cit.

¹⁸ Current tissue engineering and novel therapeutic approaches to axonal regeneration following spinal cord injury using polymer scaffolds. Op. cit.

¹⁹

Reconocimiento de

Op. Cit.

²⁰ Age-related deterioration in trabecular bone mechanical properties at material level: Nanoindentation study of the femoral neck in women by using AFM. Op. Cit.

La técnica de sinterización láser en la fabricación de *scaffolds* ha sido estudiada en otras investigaciones^{21,22,23}. Con esta técnica se ha demostrado la posibilidad del control de la porosidad en una pieza fabricada²⁴, lo que permite suponer que se puede llegar a controlar la proliferación celular en biodispositivos²⁵. Esto último es lo que no ha sido posible conseguir con otros métodos convencionales de fabricación^{26,27}. Una de las falencias del uso de esta técnica es la poca cantidad de materiales estudiados para su uso. Entre los materiales que se han utilizado con esta técnica es el Nylon este es un material que ha sido utilizado con anterioridad en aplicaciones como *scaffold*^{28,29}, de manera que se tiene certeza sobre su biocompatibilidad, toxicidad y la proliferación celular.

Este proyecto pretende por tanto, diseñar una matriz que permita estudiar la proliferación celular, en diferentes estructuras, de manera que nos acerquemos más a un comportamiento biomimético, que le permita a las células reproducirse y conformar un tejido con condiciones adecuadas para reemplazar el tejido perdido.

Este proyecto está avalado por el Grupo de investigación en materiales avanzados para micro y nanotecnología (IMAMNT). Esta propuesta es importante para la actividad actual del grupo, pues la tecnología utilizada permite tener control de las microestructuras obtenidas en la fabricación de dispositivos, lo que permite ampliar la investigación de las propiedades de estos. Para lograr esto se contó con la participación de la Universidad Autónoma de Occidente y Universidad de

²¹ *Ibid.*

²² GOODRIDGE R.D., TUCK C.J., HAGUE R.J.M.; “*Laser sintering of polyamides and other polymers*” en *Progress in Materials Science* 57 (2012) 229–267.

²³ ZHOU Wen You, LEE Siu Hang, WANG Min, CHEUNG Wai Lam, IP W Y k ; “ *v sintering of porous tissue engineering scaffolds from poly(L-lactide)/carbonated hydroxyapatite* h ” : 8 19: 535–2540.

²⁴ *Laser sintering of polyamides and other polymers. Op. Cit.*

²⁵ *Selective laser sintering of porous tissue engineering scaffolds from poly(L-lactide)/carbonated hydroxyapatite nanocomposite microspheres. Op. Cit.*

²⁶ HAUGEN Havard Jostein, MONJO Marta, RUBERT Marina, VERKET Anders, LYNGSTADAAS å k Ø b W F h ; “*Porous ceramic titanium dioxide scaffolds promote bone formation in rabbit peri-implant cortical defect model*” en *Acta Biomaterialia* 9 (2013) 5390–5399.

²⁷ MADIGANA Nicolas N., MCMAHON B h , B Timothy, YASZEMSKIC Michael J., WINDEBANKA Anthony J.; “*Current tissue engineering and novel therapeutic approaches to axonal regeneration following spinal cord injury using polymer scaffolds*” y hy y & *Neurobiology* 169 (2009) 183–199.

²⁸ DAS, Suman, et al. “*Freeform fabrication of Nylon-6 tissue engineering scaffolds*”. *Rapid Prototyping Journal*, 2003, vol. 9, no 1, p. 43-49.

²⁹ V. RISBUD, Makarand; BHONDE, Ramesh R. “*Polyamide 6 composite membranes: Properties and in vitro biocompatibility evaluation*” *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2001, vol. 12, no 1, p. 125-136.

Wisconsin (Polymer Engineering Center) en Estados Unidos. Esta cooperación resultado pretende ser muy estratégica para nuestra institución debido a que la Universidad de Wisconsin aportará el equipo de sinterización láser, el cual es un equipo de un costo muy alto, y que no tenemos actualmente en la región. El interés del grupo es poder utilizar esta tecnología para identificar la necesidad de implementación en nuestro país a través de la financiación de proyectos de carácter tecnológico.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Fabricar una estructura tridimensional utilizando la técnica de sinterizado láser, que permita estudiar los efectos de las características de fabricación en la proliferación celular.

4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

Diseñar diferentes estructuras de *scaffolds*, para ser fabricadas con la técnica de sinterización láser.

Obtener *scaffolds* por medio de la técnica de sinterización láser, variando parámetros de fabricación.

Determinar las propiedades de resistencia a la compresión de los *scaffolds*.

Implantar células madre en los diferentes *scaffolds* e identificar los factores de fabricación que afectan la proliferación celular.

5. MARCO REFERENCIAL

El diseño y fabricación de un dispositivo médico en Ingeniería de rehabilitación conlleva el estudio de diferentes aspectos tales como el tipo de material o biomaterial del cual está fabricado, la elección de la técnica de fabricación, la elección de técnicas de caracterización (p.e. mecánicas, etc.), así como también aspectos de ciencias médicas asociadas. En este sentido se presenta a continuación varios aspectos que están asociados a esta propuesta de trabajo de grado.

5.1 MARCO TEORICO

5.1.1 Biomateriales Iniciando con los biomateriales, se define un biomaterial como el material que sirve como estructura, o parte funcional, de un dispositivo médico implantable³⁰. Este material puede ser metálico, cerámico o polimérico, natural o sintético. Desde finales del siglo XIX se encuentran reportes de investigaciones en biomateriales, como Themistocles Gluck quien presentó resultados de implantes de pelvis y cadera en un congreso médico en 1890. Debido a las condiciones de asepsia y los fallos de estos biomateriales en el paciente al cabo de un tiempo, no se empiezan a utilizar los biomateriales hasta el año 1960. En este año el cirujano ortopédico Sir John Charnley presentó una prótesis para reemplazo de cadera ³¹. A partir de estos momentos los biomateriales han sido foco de investigación e innovación, permitiéndonos llegar a lo que ahora conocemos como la ingeniería de tejidos.

En Ingeniería de tejidos, algunos biomateriales son utilizados como implantes para focalizar la recuperación de un tejido específico, para esto se requiere que estos biomateriales se presenten en forma de matrices (en inglés y el término utilizado “*scaffolds*”^b de diferentes tipos, dependiendo de la aplicación que se requiera. Adicionalmente, en reparación o sustitución de tejidos, se puede tener en cuenta diseños diferentes según la aplicación^{32,33,34,35}.

³⁰ NARAYAN Roger, (2009). ***Biomedical Materials***. 1st ed. University of North Carolina, Chapel Hill: Springer.

³¹ Ibid.

³² Porous ceramic titanium dioxide scaffolds promote bone formation in rabbit peri-implant cortical defect model Op. Cit.

³³ Repair of meniscal cartilage white zone tears using a stem cell/collagen-scaffold implant Op. Cit.

³⁴ Current tissue engineering and novel therapeutic approaches to axonal regeneration following spinal cord injury using polymer scaffolds Op. Cit.

5.1.2 El Hueso En el momento de diseñar un biomaterial lo primero que se debe hacer es establecer las características del tejido que se quiere reemplazar, o la función que se quiere complementar. El hueso es un tejido conectivo duro, el cual cumple las funciones de soporte para el cuerpo, protección para las estructuras vitales, base mecánica para el movimiento, almacenamiento de sales y aporte continuo de células sanguíneas³⁶. Existen diferentes clasificaciones del hueso según diferentes parámetros, una de estas es según su estructura, en la cual hay dos clasificaciones hueso esponjoso y hueso compacto. El hueso esponjoso es de baja densidad y es aquí donde se encuentra la vascularización del hueso, la médula amarilla, médula roja y los osteocitos. La alta vascularización permite el intercambio de nutrientes para el mantenimiento de las células y los tejidos. Por su parte el hueso compacto es un hueso de alta densidad, lo que le brinda mayor rigidez y este es el que aporta la fuerza para soportar el peso del cuerpo. Además de esto es donde se encuentran las inserciones musculares, que es lo que nos permite generar la base mecánica para el movimiento³⁷.

Otra clasificación de los huesos se encuentra según su forma; huesos largos, los cuales son cilíndricos que se encuentran principalmente en las extremidades y están compuestos por una epífisis, hueso esponjoso, diáfisis, cobertura en hueso compacto y hueso esponjoso en el centro, en esta última se encuentra la médula ósea roja que produce los osteocitos y las células madre mesenquimales. También compone los huesos largos la metáfisis que es la transición entre los dos tipos de hueso. Los huesos cortos, tienen forma de cubo, se encuentran en la mano y el pie, y principalmente están compuestos por hueso esponjoso. Los huesos planos, cumplen la función de proteger los órganos vitales, se encuentran en el cráneo y la caja torácica, y están compuestos por dos capas de hueso compacto y entre estas hueso esponjoso, a diferencia de los huesos largos son huesos planos en vez de cilíndricos, y no poseen producción de células madre mesenquimales. Los huesos irregulares, no se pueden incluir en ninguna de las otras categorías pues no poseen una forma característica, entre estos se encuentran los huesos de la cara y las vértebras. Los huesos sesamoideos, estos se encuentran en las articulaciones y su función es la protección de los tendones frente al desgaste, un ejemplo de este es la rótula de la rodilla³⁸.

³⁵ Freeform fabrication of Nylon-6 tissue engineering scaffolds. Op. Cit.

³⁶ ROSS Michael H., PAWLINA Wojciech, (2007). Histología, Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular. 5th ed. Buenos Aires: Médica Panamericana.

³⁷ Ibid.

³⁸ Ibid.

5.1.3 Polímeros Actualmente se estudian los polímeros como uno de los principales biomateriales, debido a sus características físicas, mecánicas y de biocompatibilidad. Los polímeros son cadenas largas formadas por muchos monómeros (carbono, hidrogeno y algunos contienen otros elementos) unidos entre sí. El número de monómeros que componen el polímero completo puede variar, esto se conoce como grado de polimerización (GP), del cual dependen gran parte de las propiedades del producto final, el estado a temperatura ambiente y el punto de fusión principalmente ³⁹. Entre los monómeros del polímero se encuentran dos tipos de enlaces, primarios y secundarios, los enlaces primarios son enlaces fuertes que mantienen la cadena junta, son los enlaces moleculares. Los enlaces secundarios son enlaces intermoleculares, los cuales son de baja energía⁴⁰.

Todas estas características de los polímeros, son determinantes para las características de los productos finales en los cuales sean utilizados. En el caso del proceso de producción de *scaffolds* es muy importante tener control sobre las diferentes propiedades del material para las características que se quieren para el dispositivo⁴¹. Los parámetros de biocompatibilidad, absorción y degradabilidad están asociados directamente al material y su composición como se mencionó antes. Por su parte las características mecánicas y físicas, entre las que se destaca la porosidad, se logran en el proceso de fabricación del *scaffold*.

5.1.4 Nylon El nylon es un polímero termoplástico, esta es una clasificación que se le da a los polímeros acorde a su comportamiento térmico. Los termoplásticos son polímeros que debido a su estructura molecular, cadenas largas unidas entre sí por enlaces secundarios, al calentar el material este se vuelve líquido y luego al enfriarse vuelve a ser sólido, esto permite moldear a una forma deseada, y es un proceso que se puede repetir cuantas veces sea necesario. Este comportamiento es muy importante para el desarrollo de este proyecto, debido a que el método de sinterización láser requiere que el material tenga esta transición de estados de manera reversible sin cambiar la composición o el comportamiento del material⁴².

El nylon es un material que se ha demostrado como biocompatible en diferentes

³⁹ SHACKELFORD James F., (2005). **Introducción a la Ciencia de Materiales para Ingenieros**. 6ta ed. Ribera de Loira, Madrid, España: Pearson Educación S.A.

⁴⁰ Ibid.

⁴¹ Porous ceramic titanium dioxide scaffolds promote bone formation in rabbit peri-implant cortical defect model Op. Cit.

⁴² Ibid.

investigaciones. Entre estas se encuentra una publicación en el *journal of biomaterial science*, en este se evalúa la biocompatibilidad de membranas de nylon por medio de diferentes ensayos, entre los cuales se encuentran el ensayo MTT (3-(4,5-[dimethylthiazol](#)-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), el cual fue utilizado en este proyecto para comprobar la biocompatibilidad de las matrices resultantes. En dicho artículo se realizaron 96 cultivos, con células NIH3T3, en un medio a 37° C, con 5% CO₂ y 95% aire, por un periodo de 24 horas, en diferentes concentraciones celulares entre 10% y 50% y utilizando como medio de control poliestireno, un material comprobado como biocompatible con anterioridad⁴³.

Los resultados encontrados en dicho artículo muestran que los cultivos realizados en el nylon, indiferente a la concentración del cultivo, presentan la misma viabilidad celular que el medio de control. Esto demuestra que el las poliamidas, o el nylon, es un material biocompatible lo que permite que este sea utilizado en las aplicaciones deseadas en este proyecto⁴⁴.

5.1.5 Método De Sinterización Láser Existen diversos métodos para fabricar matrices a partir de polímeros, entre ellos uno de los más recientes es el sinterizado láser, el cual es un método de prototipado rápido que utiliza la manufactura aditiva para la construcción de estructuras solidas con diferentes materiales⁴⁵. Inicialmente este tipo de manufactura ha sido utilizado para generar diferentes tipos de prototipos, por lo que los materiales utilizados para esto han sido poco estudiados, pero viendo las ventajas que tiene este método frente a otros métodos de producción, se está avanzando para generar producción en masa⁴⁶.

El método consiste en la realización de un diseño por medio de asistencia computacional (CAD de las siglas en inglés Computer Asisted Desing), en el cual se controla el tamaño y la estructura que se quiere tener, incluyendo la porosidad. Luego este diseño es exportado en un formato STL e importado al equipo de sinterizado láser. La sinterización Láser es una técnica que permite partir del diseño a la producción de piezas para su uso final. Con esta técnica se evita la realización de procesos costosos de mecanizado para definir la forma final de un producto.

⁴³Polyamide 6 composite membranes: Properties and in vitro biocompatibility evaluation. Op. cit.

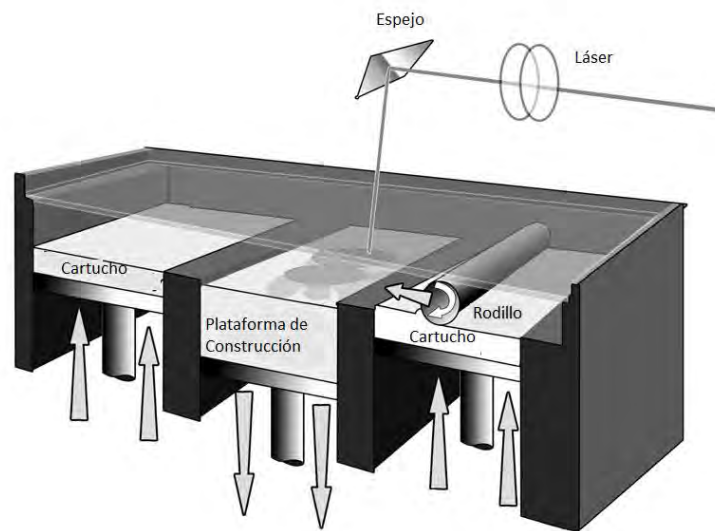
⁴⁴Ibid.

⁴⁵Laser sintering of polyamides and other polymers Op. cit.

⁴⁶Ibid.

El equipo de sinterizado láser tiene como entrada el material, en nuestro caso Nylon, pulverizado el cual se encuentra en una cámara llamada cartucho, al lado de esta se encuentra la plataforma de construcción. Un rodillo mueve el material del cartucho a la plataforma donde un láser impacta el polvo, aumentando su temperatura haciendo que se empiecen a unir las partículas formando un sólido. Luego el rodillo pasa de nuevo de la plataforma a otro compartimento donde se dejan los residuos, la plataforma baja un poco y el cartucho sube. Este proceso se repite cuantas veces sea necesario formando capas, hasta lograr el sólido completo⁴⁷. En la Figura1, se puede ver este proceso de manera gráfica.

Figura 1. Diagrama equipo de sinterización láser



Fuente: R.D. Goodridge, C.J. Tuck, R.J.M. Hague; "*Laser sintering of polyamides and other polymers*". Progress in Materials Science 57 (2012). p. 232.

Los parámetros que se deben tener en cuenta para controlar un equipo de sinterización láser son: la distancia entre el láser y la plataforma, la temperatura en la plataforma, el grosor de las capas, la velocidad del barrido, el tiempo de retardo del motor y la potencia del láser. Existen reportes que explican la

⁴⁷ Ibid.

importancia de cada uno de estos valores, y los rangos utilizados para la producción de piezas⁴⁸.

En esta investigación la mayoría de parámetros se mantuvieron constantes y se utilizaron únicamente como variables la separación de barrido del láser y la potencia del láser. Estos dos parámetros fueron escogidos después de realizar una revisión de literatura donde se encontró que una de los conceptos más importantes en el momento de lograr variación en las propiedades mecánicas y en la precisión dimensional, es la densidad de energía (ED). Esta se entiende por la energía que es proporcionada por el láser por milímetro cuadrado al impactar el polvo⁴⁹.

El comportamiento de la ED se describe en la siguiente ecuación

$$ED = \frac{Lp}{SS*BS} \quad (1)$$

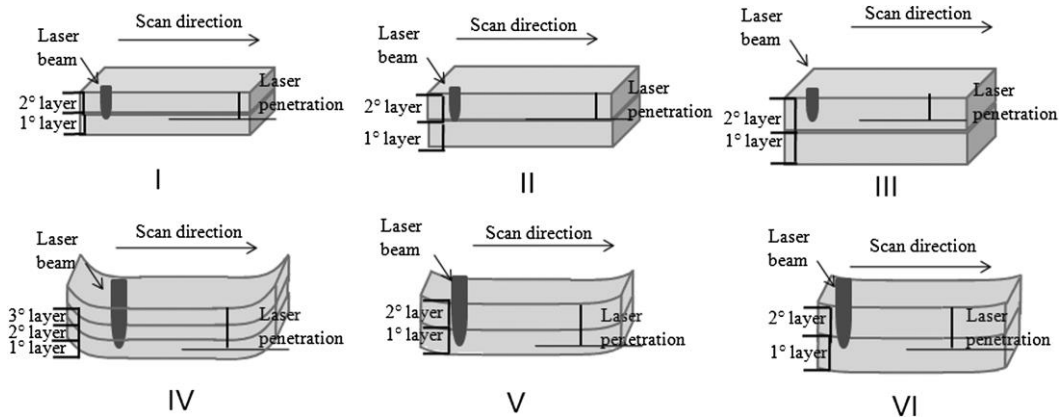
Donde Lp es la potencia del láser, SS es la separación de barrido del láser y BS es la velocidad de barrido del láser. En esta investigación se mantuvo BS como una constante, 200 in/s que equivalen a 5080 mm/s.

La ED que se debe utilizar depende del material a utilizar, su comportamiento térmico, y de las propiedades que se esté buscando resaltar en el resultado final, por lo que se trabaja con ensayo y error. A continuación en la Figura 2 se muestra de manera gráfica como la variación de ED afecta el resultado final del proceso.

⁴⁸Selective laser sintering of porous tissue engineering scaffolds from poly(L-lactide)/carbonated hydroxyapatite nanocomposite microspheres Op. cit.

⁴⁹ PEREIRA T.F., SILVA M.A.C., OLIVEIRA M.F., MAIA I.A., SILVA J.V.L., COSTA M.F. & THIRÉ
1 : “ h v y 3-
hydroxybutyrate b ” hy y 7:4 75-
285.

Figura 2. Energía suministrada por el láser al material



Fuente: “*Effect of process parameters on the properties of selective laser sintered Poly(3-hydroxybutyrate) scaffolds for bone tissue engineering*” Virtual and Physical prototyping (2012). p. 279.

En esta se pueden identificar 6 imágenes diferentes, estas corresponden a diferentes valores de ED y diferentes valores de grosor en las capas de material. En la primera y la segunda imagen se puede identificar que la ED fue suficiente para penetrar la primer capa afectando levemente la segunda capa, que es lo ideal. En la III se puede ver que la ED no fue suficiente para penetrar la primer capa completa, esto genera que no haya una buena fusión entre las capas. Finalmente en los casos IV, V y VI se puede ver que la ED es muy alta y penetra varias capas al mismo tiempo, esto causa que se curve el material variando la forma final del sólido⁵⁰.

Teniendo en cuenta los niveles de ED con que se debe trabajar para el material que se quiere utilizar, se pueden variar los valores de SS y Lp de manera que se encuentren diferentes propiedades. El valor más determinante para la variación de parámetros es el Lp, debido a que en caso de utilizar un Lp muy bajo causa que no se dé una buena sinterización entre las diferentes capas lo que generará un producto con poca precisión con relación al diseño y con malas propiedades mecánicas. En el caso opuesto, al utilizar valores muy altos de energía se puede desnaturalizar el material lo que generaría cambios en la estructura molecular del material, por ende cambios en sus propiedades⁵¹. Lo anterior permite control de las propiedades mecánicas de la estructura.

⁵⁰ Ibid.

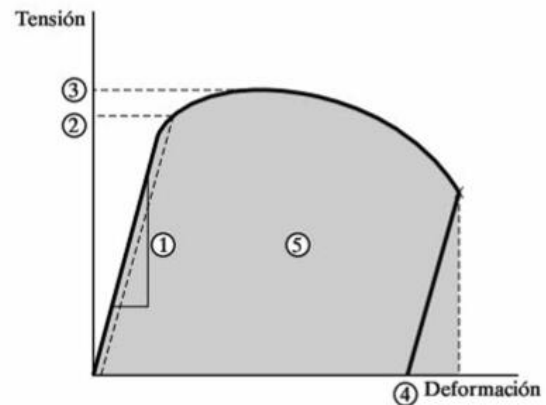
⁵¹ ZHOU Wen You, WANG Min, CHEUNG Wai Lam, IP Wing Yuk (2010). Selective Laser Sintering of Poly(L- Lactide)/Carbonated Hydroxyapatite Nanocomposite Porous Scaffolds for Bone Tissue

5.1.6 Propiedades Mecánicas Del Hueso Las propiedades mecánicas de un material proporcionan información acerca del comportamiento del material cuando es sometido a cargas, a partir de estas se determina cuanto es la resistencia del material o cuánto será la deformación del material al ser sometido a determinadas cargas. Uno de los ensayos que se realiza para determinar el comportamiento de un material es el ensayo de compresión, este consiste en someter una probeta del material que se quiere analizar a una carga que aumenta de manera lineal, y se mide la deformación que esta carga genera sobre el material⁵².

El resultado de este análisis es una gráfica de tensión deformación como la que se muestra a continuación, esta es una imagen de un ensayo de tracción, que presenta los mismos resultados que un ensayo de compresión.

Figura 3. Comportamiento mecánico de un material

Figura 6.6. Las propiedades mecánicas clave obtenidas en un ensayo de tracción son: 1, módulo elástico, E ; 2, límite elástico, $R_{p0.2}$; 3, resistencia a tracción, R_m ; 4, ductilidad, $100 \times \epsilon_{rotura}$ (nótese que tiene lugar una recuperación elástica antes de la rotura); y 5, tenacidad = $\int \sigma d\epsilon$ (medida bajo carga; por lo tanto, la línea discontinua es vertical).



Fuente: James F. Shackelford, (2005). *Introducción a la Ciencia de Materiales para Ingenieros*. 6ta ed. Ribera de Loira, Madrid, España: Pearson Educación S.A. p. 183

Como está indicado en la imagen se pueden obtener diferentes zonas de esta figura. Lo primero que se debe identificar es que los materiales poseen un comportamiento elástico y un comportamiento plástico. El comportamiento elástico

Engineering. En: Tissue Engineering, Daniel Eberli (Ed.), ISBN: 978-953-307-079-7 [Consultado en Julio 29 de 2013] Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/tissue-engineering/selective-laser-sintering-of-poly-l-lactide-carbonated-hydroxyapatite-nanocomposite-porous-scaffolds>

⁵²Introducción a la Ciencia de Materiales para Ingenieros Op. Cit.

consiste en que al retirar la carga aplicada, el material retorna a su forma original, no hay una deformación permanente, esto se ve representado en la parte lineal de la curva. El comportamiento plástico es cuando la carga aplicada genera una deformación permanente, o sea que al retirar la carga el material no retornara a su forma original. En la figura esta zona es la parte curva de la gráfica. Finalmente encontramos una tercera zona, que es la ruptura, esto es cuando la carga aplicada es lo suficientemente alta para generar una ruptura del material, este marca el fin de la prueba de compresión⁵³.

En esta gráfica, como lo indica la Figura, podemos obtener 5 datos característicos. Marcado con el número 1 se encuentra el modulo elástico, este es la pendiente de la zona elástica. Este módulo nos indica la resistencia del material a la deformación, la cantidad de carga aplicada que resiste el material ante la compresión sin generar daños estructurales. Con el número 2 se encuentra el límite elástico, este es un punto en la gráfica en la cual se presenta el cambio de comportamiento elástico a plástico, también se entiende como la máxima carga que puede soportar el material sin perder su estructura⁵⁴.

En el punto 3 se encuentra la resistencia a la tracción o compresión, este es el punto más alto de la curva, que se identifica como la resistencia máxima del material. En el punto 4, se encuentra la ductilidad, está la vemos identificada con una línea recta a partir del punto de ruptura. Esta posee esta forma pues en el momento de la ruptura, el material tiene una pequeña recuperación elástica. Finalmente vemos identificado con el número 5 el área bajo la curva, esta es la tenacidad, esta al ser la integral de la curva, nos presenta la interacción entre las características de ductilidad y resistencia⁵⁵.

Tener control sobre estas propiedades mecánicas mencionadas anteriormente se puede lograr por medio del control de la microestructura del *scaffold* lo que es muy importante para la ingeniería de tejidos. En literatura encontrada se ha demostrado que hay una relación entre la edad de la persona y el comportamiento mecánico del hueso⁵⁶.

⁵³ Ibid.

⁵⁴ Ibid.

⁵⁵ Ibid.

⁵⁶ Age-related deterioration in trabecular bone mechanical properties at material level: Nanoindentation study of the femoral neck in women by using AFM. Op. Cit.

Se encontró que con el paso de los años hay un cambio en la estructura de la matriz del hueso, encontrando un tamaño de grano más grande, lo que genera que se modifiquen las propiedades mecánicas⁵⁷.

Cuadro 1. Propiedades de hueso trabecular en mujeres jóvenes vs mujeres adultas.

Propiedades de hueso trabecular en mujeres jóvenes vs. Mujeres adultas		
Propiedad	Rango de edad	Promedio
Tamaño de grano (nm)	Joven	59
	Adulta	120
Módulo Elástico (GPa)	Joven	1.28
	Adulta	1.97
Nanodureza (GPa)	Joven	0.59
	Adulta	0.92

Fuente Petar Milovanovic, Jelena Potocnik, Danijela Djonic, Slobodan Nikolic, Vladimir Zivkovic, Marija Djuric, Zlatko Rakocevic, (2012). Age-related deterioration in trabecular bone mechanical properties at material level: Nanoindentation study of the femoral neck in women by using AFM. *Experimental Gerontology*. 47, pp.154 – 159.

Para dicho estudio se tomaron 8 muestras de hueso trabecular de mujer, 5 mujeres jóvenes, alrededor de los 32 años de edad y 3 mujeres adultas, alrededor de los 88 años de edad. En la tabla titulada Tabla 1, se presentan los resultados más relevantes de este estudio para el proyecto descrito en este documento⁵⁸.

En el cuadro 1, se pueden ver los resultados del estudio mencionado anteriormente, donde se ve la diferencia entre el módulo elástico del hueso de una persona de edad adulta y una persona joven. El módulo elástico es de gran importancia en el momento de realizar la evaluación de un material pues este define la deformación de un material a razón de la fuerza aplicada. En el artículo también explican que en el momento que el material recibe un impacto, a mayor módulo elástico la disipación de energía es mayor, al aplicar esto al hueso quiere

⁵⁷ Ibid.

⁵⁸ Ibid.

decir que se requiere de impactos más fuertes en personas jóvenes para generar una fractura⁵⁹.

Al establecer un control sobre la microestructura del diseño de un implante para ingeniería de tejidos, no solo se deben tener en cuenta las propiedades mecánicas, se debe lograr un punto donde se optimicen las propiedades mecánicas y se permita la funcionalidad del tejido, y este caso no es la excepción. Para realizar el diseño estructural de la matriz se tienen en cuenta los parámetros biológicos y fisiológicos. En este caso se estableció control sobre la porosidad del *scaffold*.

5.1.7 Tamaño De Poro Cuando se habla de la regeneración de tejido óseo se deben tener en cuenta varias características, primero como ya se vio todas las propiedades mecánicas para que el material supla la función de soporte. En segunda instancia debe permitir la regeneración de tejido óseo, para lo que se necesita de poros e interconectividad de los poros, la característica de estos poros es que son poros grandes, pues requiere de la formación de las diferentes estructuras que conforman el hueso. Finalmente, la tercera condición para tener en cuenta es el desarrollo del tejido conectivo interno al hueso⁶⁰.

Si los poros son pequeños alrededor de las 100 μm , no se encontrara espacio para el crecimiento de hueso, pero genera buenas propiedades mecánicas y permite la regeneración del tejido conectivo. El caso contrario, poros superiores a las 700 μm presenta excelentes condiciones para la regeneración de tejido óseo, y sus diferentes estructuras, pero las propiedades mecánicas no son las mejores y no se produce reparación o regeneración del tejido conectivo. Por ende se debe buscar un tamaño de poro que permita la regeneración de tejido conectivo, regeneración de tejido óseo y finalmente que tenga propiedades similares a las del hueso natural⁶¹.

En el artículo⁶² se habla que el tamaño más adecuado para trabajar es de 500 μm por lo que para este proyecto de estudio se decidió trabajar con *scaffolds* de 300 μm 400 μm 500 μm 600 μm y 700 μm .

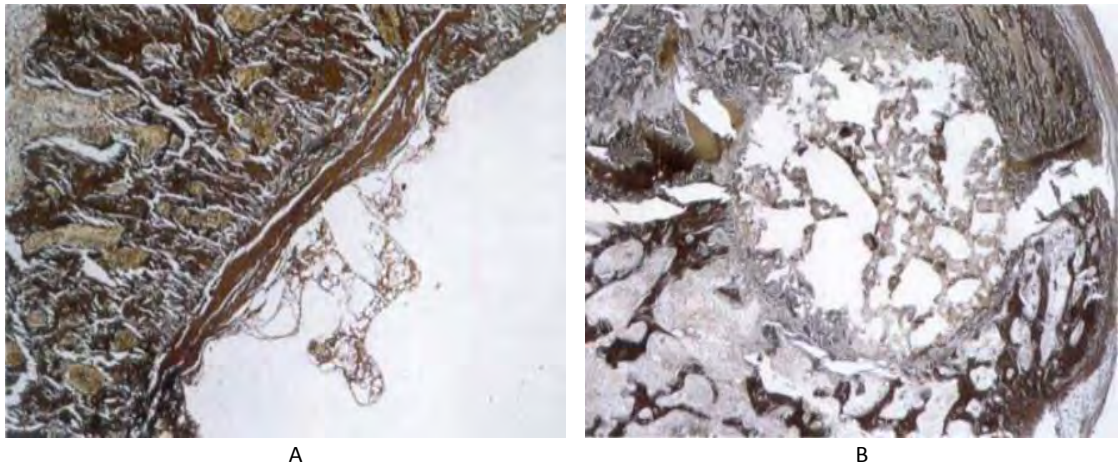
⁵⁹ Ibid.

⁶⁰ Bone formation in coralline hydroxyapatite. *Op. Cit.*

⁶¹ Ibid.

⁶² Ibid.

Figura 4. Imagen histológica de la recuperación de tejido óseo



Fuente Jobst-HennerKuhne, Rainer Bart, Bertha Frisch, ClausHamme, Volkmar Jansson, Markus Zimmer, (1994). Bone formation in coralline hydroxyapatite. *Acta Orthop Scand.* 65 (3). pp.246 – 252

En la imagen A de la Figura 4, es una imagen histológica tomada 6 semanas después de implantada una matriz con poros de 200 μm en tejido óseo, en la cual se puede ver que no hay penetración de tejido hacia el interior del *scaffold*. Por otra parte en la imagen B, imagen de histología a 2 semanas de implantada una matriz con poros de 500 μm en tejido óseo, en la cual se puede ver que hay una buena penetración de tejido mesenquimal⁶³.

5.1.8 Mecanismos De Reparación De Defectos Óseos El hueso al igual que el resto de tejidos del cuerpo humano, posee un mecanismo de reparación, este consiste cicatrizar y luego recuperar el tejido. El proceso detallado en el hueso inicia con la generación de capilares, los cuales son de suma importancia pues es el torrente sanguíneo es el medio de transporte para la llegada de las células que generaran la regeneración. En el lugar de la reparación se encuentran presentes células madre mesequimales (MSC) las cuales tienen el potencial para diferenciarse en varios tipos de células, más adelante se presenta esta célula de manera más completa⁶⁴.

Las MSC presentes se diferencian inicialmente en fibroblastos y secretan colágeno, entre estos dos conforman el tejido de granular el cual sirve como matriz para la llegada de otras células. Este tejido granular se empieza a aumentar su densidad por la llegada de más células hasta que este conforma un cartílago. En

⁶³ Ibid.

⁶⁴ Histologia, Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular *Op. cit.*

cuanto se conforma el callo cartilaginoso, el cual cumple la función de mantener unidos los extremos de la fractura, las MSC se empiezan a diferenciar en osteoblastos, las cuales empiezan a generar una capa de tejido óseo alrededor del callo cartilaginoso. Luego estos osteoblastos empiezan a invadir el callo cartilaginoso hasta que finalmente lo reemplazan por un callo óseo, conformado por osteoblastos, tejido óseo⁶⁵.

A pesar del buen mecanismo de reparación del tejido óseo, existen algunos casos en los que este mecanismo no es suficiente, estos casos se conocen como defectos óseos críticos⁶⁶. En estos casos el defecto es lo suficientemente grande para que se genere una cicatrización más no hay una recuperación del tejido como tal, por lo tanto no se recuperan las funciones del hueso tales como soporte motor, almacenamiento de minerales o protección de órganos⁶⁷. Se han realizado varios estudios donde evalúan diferentes ayudas para mejorar la reparación celular en este tipo de defectos, con hueso autólogo⁶⁸ o utilizando otros materiales para formar matrices o *scaffolds* que funcionen como soporte.

Para el desarrollo de estas matrices se debe también tener en cuenta que el mecanismo de reparación esta guiado por señales bioquímicas, estas son las que indican el lugar donde se está realizando la reparación, e indican a las células madre, cual es la diferenciación que debe realizar, esto diferencia que tipo de tejido se va a generar⁶⁹. Este es el punto actual de las investigaciones, cómo diferenciar los mecanismos del cuerpo para generar una regeneración guiada y obtener el tejido deseado. En las células mesenquimales, que son las células progenitoras de los tejidos conectivos que componen el sistema óseo, ya se ha realizado un avance, y se ha identificado como hacer que esta se diferencie en tejido cartilaginoso o tejido óseo⁷⁰.

5.1.9 Células Y Cultivos Celulares Para realizar las pruebas de proliferación celular existen una serie de tipos de célula que se pueden utilizar, de manera que para dar paso al proyecto se pasó a elegir el tipo de células a utilizar en estas pruebas. El tipo de célula ideal para la realización de estas investigaciones son las células madre, debido a que estas son células que se pueden renovar a sí mismas

⁶⁵ Ibid.

⁶⁶

Op. Cit.

⁶⁷ Ibid.

⁶⁸ Ibid.

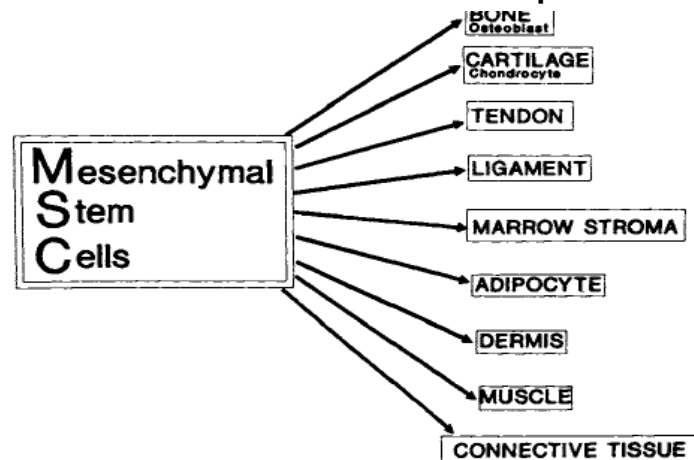
⁶⁹ CAPLAN Arnold I., (1991). Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Orthopaedic Research*. 9, pp.641 – 650.

⁷⁰ Ibid.

por división celular lo que hace más fácil la identificación de su proliferación. Además de esto, estas células tienen la capacidad de dividirse y generar más células madre, o si son estimuladas, generar nuevas células especializadas⁷¹.

Existen dos tipos de células madre, embrionarias y maduras. Las células madre embrionarias son aquellas encontradas en los embriones, y se dividen para dar origen a todas las células y todos los tipos de células del cuerpo en el desarrollo del embrión. Las células madre maduras, o adultas, son aquellas que se encuentran en diferentes nichos, en el ser humano estos nichos están presentes en el cerebro, la medula ósea, los vasos sanguíneos, musculo esquelético, hígado entre otros. La principal función de estas células es la reparación de tejidos⁷², pues ya tienen una diferenciación y no pueden reproducir cualquier tipo de células pero si una variedad. En este trabajo se utilizarían células madre adultas obtenidas de la medula ósea de ratas, que son células madre mesenquimales.

Figura 5 Diferenciación de células madre mesenquimales.



Fuente Arnold I. Caplan, (1991). Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Orthopaedic Research*. 9, pp.642.

Las células madre mesenquimales (MSC) como se puede ver en la Figura 5, son células madre que tienen la posibilidad de generar una amplia variedad de tejidos. Entre estos se encuentran tejidos del sistema esquelético como hueso, cartílago, tendón, ligamento y estroma medular. Además se encuentran adipocitos, dermis,

⁷¹ National Institutes of Health (2002). **Stem Cell Basics**. [ONLINE] Available at: <http://stemcells.nih.gov/info/basics/pages/basics1.aspx>. [Last Accessed Febrero 23 de 2012].

⁷² Ibid.

células musculares y tejido conectivo⁷³. Para el desarrollo de esta tesis, se busca trabajar con el primer grupo mencionado, el tejido óseo.

Para lograr que las células se diferencien de manera efectiva en la línea celular que se desea, se deben tener varios factores en consideración. El primero y más importante es utilizar los factores de crecimiento adecuados y brindar la señalización adecuada. Por señalización se entiende una serie de marcadores bioquímicos que se encuentran en la matriz extracelular, y en la superficie de la membrana celular, los cuales guían a la célula hacia qué tipo se debe diferenciar.

Un segundo punto muy importante es la concentración de células, ya que algunos tejidos requieren de ciertos espacios para su regeneración, este es el caso del hueso. En el estudio referenciado⁷⁴ explican que realizaron inicialmente el desarrollo de cartílago, el cual fue realizado con éxito, a partir de una alta concentración celular. Luego se pensó en realizar el mismo diseño experimental pero para hueso, tomando como punto de partida el cartílago. Un tiempo después, se identificó que el hueso no lograba su regeneración a partir de la base de cartílago, si no que se necesitaba utilizar una concentración celular mucho menor de manera que se lograran formar depósitos de hueso⁷⁵.

Para identificar los parámetros de sinterización láser que afectan la proliferación celular, se deben realizar varios cultivos celulares sobre las matrices fabricadas. Para lograr esto en primer instancia se debe determinar el número de células que se deben plantar, además de lo ya expuesto en el párrafo anterior, para que el estudio tenga viabilidad, ya que si se plantan muy pocas no habrá una interacción suficiente para que exista un comportamiento normal. Por el contrario si se plantan muchas células, estará saturado el medio y las células morirán.

Para determinar el número de células a implantar se realizará una curva de calibración utilizando el método MTT. Este método consiste en evaluar la viabilidad de las células a partir de una reacción enzimática generada por la acción de la mitocondria, lo que permite determinar la funcionalidad mitocondrial, que permite saber el número de células vivas⁷⁶.

⁷³ Mesenchymal Stem Cells Op. Cit.

⁷⁴ Ibid.

⁷⁵ Ibid.

⁷⁶ NAVIA MOROCHO Heidy Catalina, (2011). *TESIS: Evaluación in vitro del potencial citotóxico, genotóxico y efecto en el ciclo celular de extractos de tres especies de esponjas marinas del caribe*

El MTT es principalmente un ensayo utilizado para evaluar la citotoxicidad de agentes terapéuticos, y la supervivencia de las células, por lo que es utilizado para evaluar la proliferación celular. El método consiste en realizar el cultivo celular y se añade Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) y se incuba a 37°C durante un tiempo determinado. Luego el MTT es reducido por la acción de la succinato-deshidrogenasa mitocondrial a formazán, este último compuesto es hidrofóbico y posee una coloración azul, lo que permite diferenciar las células vivas de las células no vivas. Finalmente se evalúa la densidad óptica del compuesto para determinar la cantidad de formazán producido, que es proporcional al número de células activas⁷⁷.

Al obtener una curva de calibración reproducible, con un coeficiente de relación superior a 0.98 se puede determinar el número de células a sembrar en cada una de las matrices y repetir el procedimiento con MTT para evaluar la proliferación celular según los diferentes parámetros de fabricación establecidos⁷⁸.

5.1.10 Método De Esterilización Otro aspecto a tener en cuenta en el proceso de análisis de la proliferación celular en un *scaffold* es la esterilización necesaria para que las células no se vean afectadas por agentes externos. Se encuentran varios procedimientos para lograr la esterilización de un material, calor húmedo y calor seco, óxido de etileno o radiación ionizante, entre otros. La mayoría de estos métodos utiliza el calor como parte del proceso, sometiendo el material a altas temperaturas⁷⁹.

Teniendo en cuenta que estos polímeros tienen puntos bajos de t_g , t_f y t_d , los métodos de esterilización que utilizan la temperatura para eliminar bacterias y agentes externos, afectarían la estructura del polímero por lo cual no serán tomados en cuenta. El método sugerido para la esterilización del Nylon es el método de radiación ionizante, en este se varía la cantidad de radiación, ya que esta también puede afectar la estructura del polímero, se utilizan agentes de enfriamiento para mantener controlada la temperatura y según estos dos factores

colombiano. 1st ed. Colombia: Universidad Nacional de Colombia sede Medellín; Facultad de ciencias; Escuela de Biociencias.

⁷⁷ Ibid.

⁷⁸ Ibid.

⁷⁹ BERNKOPF M.; "Sterilisation of Bioresorbable Polymer Implants"; Medical Device Technology, vol. 18, no. 3, May-June (2007).

se establece el tiempo del procedimiento. Entre los agentes de enfriamiento se utiliza el hielo seco⁸⁰.

⁸⁰Selective Laser Sintering of Poly(L- Lactide)/Carbonated Hydroxyapatite Nanocomposite Porous Scaffolds for Bone Tissue Engineering, Tissue Engineering Op. cit.

6 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

El proyecto consta de 4 etapas, la primera es la etapa de diseño en la cual se identificó en la literatura los parámetros con los que debe contar una matriz diseñada con el fin de lograr la recuperación de tejido óseo, en esta se evalúan los parámetros de porosidad, tamaño de poro y las propiedades mecánicas necesarias.

En segunda instancia esta la etapa de fabricación de las muestras, en esta se realizaron 2 diseños experimentales que permitieron identificar las propiedades de fabricación adecuadas para lograr los parámetros diseñados.

La tercera etapa fue el desarrollo de las pruebas de compresión, estas permitieron comprobar que los resultados obtenidos en la segunda etapa cumple con los parámetros con los que se realizó el diseño en la primera etapa del proyecto.

Finalmente la cuarta y última etapa del proyecto fue la realización de los cultivos celulares, en los cuales se identifica la biocompatibilidad de las matrices y evalúa el fin último del proyecto que es identificar como los parámetros controlados por el método de sinterización láser afectan la proliferación celular.

6.1 DISEÑO DE SCAFFOLDS UTILIZANDO HERRAMIENTAS COMPUTACIONALES

La primera etapa de desarrollo del proyecto consistió en establecer las características con las que debían contar los *scaffolds*. Las características que se establecieron como influyentes para el diseño de los *scaffolds* fueron, el tamaño de poro necesario para que se pueda dar el crecimiento del tejido óseo, la porosidad y la interconectividad de los poros que permita que las células se proliferen de manera adecuada, y los parámetros de resistencia a la compresión del hueso humano, de manera que se fabriquen matrices que tengan características similares a las del hueso.

Lo primero que se estableció fue que se iba a trabajar con tamaños de poro 400 μm , 500 μm , 600 μm y 700 μm . Luego se diseñaron los poros utilizando geometrías simples, como cilindros y prismas. Con estos dos parámetros fijados,

se calculó el volumen que ocuparía cada uno de los poros, teniendo en cuenta su geometría y su diámetro o lado según sea el caso, para poder establecer el número de poros que se requería crear en cada una de las caras del *scaffold* para adquirir el porcentaje de volumen deseado.

Finalmente se realizó una primera impresión de *scaffolds* para ver la proximidad del diseño al resultado obtenido.

6.2 OBTENCION DE SCAFFOLDS CON DIFERENTES PARAMETROS DE FABRICACIÓN

Para la segunda etapa de este proyecto se realizaron dos diseños experimentales, el primer diseño experimental fue realizado para establecer los rangos de parámetros que se debían utilizar para potencia del láser y separación de barrido del láser. En este fueron fabricadas 54 muestras con forma de prisma y poros de 400 μm , 500 μm . Los parámetros utilizados fueron de Lp (7 W – 15 W) y SS (0.18 mm – 0.2 mm) para cada tamaño de poro.

Tabla 1 Características de fabricación de muestras utilizadas en el primer barrido

Muestra	Tamaño de poro (μm)	Scan Sapcing (mm)	Potencia de láser (W)
1	400	0.18	7
2	400	0.18	8
3	400	0.18	9
4	400	0.18	10
5	400	0.18	11
6	400	0.18	12
7	400	0.18	13
8	400	0.18	14
9	400	0.18	15
10	400	0.19	7
11	400	0.19	8
12	400	0.19	9
13	400	0.19	10
14	400	0.19	11
15	400	0.19	12
16	400	0.19	13

Tabla 2 (continuación)

17	400	0.19	14
18	400	0.19	15
19	400	0.2	7
20	400	0.2	8
21	400	0.2	9
22	400	0.2	10
23	400	0.2	11
24	400	0.2	12
25	400	0.2	13
26	400	0.2	14
27	400	0.2	15
28	500	0.18	7
29	500	0.18	8
30	500	0.18	9
31	500	0.18	10
32	500	0.18	11
33	500	0.18	12
34	500	0.18	13
35	500	0.18	14
36	500	0.18	15
37	500	0.19	7
38	500	0.19	8
39	500	0.19	9
40	500	0.19	10
41	500	0.19	11
42	500	0.19	12
43	500	0.19	13
44	500	0.19	14
45	500	0.19	15
46	500	0.2	7
47	500	0.2	8
48	500	0.2	9
49	500	0.2	10
50	500	0.2	11
51	500	0.2	12
52	500	0.2	13
53	500	0.2	14
54	500	0.2	15

Luego en un microscopio *Nikon® Eclipse ME 600* y la ayuda del software *Q capture pro®* se tomaron imágenes de cada una de las muestras y se midió el tamaño de poro en tres poros diferentes de un mismo *scaffold* seleccionados al azar. Estos resultados fueron consignados en un tabla en el software *Microsoft® Excel* y utilizando las herramientas estadísticas del mismo se realizó un análisis ANOVA. Con estos resultados se redujo el rango de parámetros para trabajar con los que entregarán los mejores resultados de precisión y exactitud.

En los resultados para este primer diseño solo se presentan los resultados para L_p entre 7 W y 11 W debido a que al realizar la fabricación de las muestras con L_p mayor a 11 W, se encontraban los *scaffolds* totalmente sinterizados, tapando los poros, lo que no permitía realizar una medida exacta del tamaño de poro.

Figura 6 Equipo DTM Sinterstation 2500 utilizado para la fabricación de los scaffolds



En el segundo diseño experimental se maximizaron las propiedades mecánicas, en este caso, el módulo elástico de las muestras. Para este segundo diseño se realizaron 40 muestras, con cuatro repeticiones por cada combinación de parámetros, con variables de potencia y separación entre línea y línea de barrido de: 8 - 12 Watts y 0.18 mm - 0.19mm respectivamente, al ser estos los mejores resultados del primer experimento.

Tabla 2 Características de fabricación muestras utilizadas en la caracterización mecánica sin poros

Muestra	Scan (mm)	Spacing	Potencia de láser (W)
1	0.18		8
2	0.18		9
3	0.18		10
4	0.18		11
5	0.18		12
6	0.19		8
7	0.19		9
8	0.19		10
9	0.19		11
10	0.19		12

Finalmente después de maximizar las propiedades mecánicas, se fabricaron muestras con variación en el tamaño de poro, pero manteniendo los parámetros de fabricación fijos, de manera que se pudiera evaluar esta característica. Se utilizó $L_p=11$, $SS=0.19$, realizando cuatro muestras para cada combinación de parámetros.

Tabla 3 Características de muestras con poros utilizadas en pruebas mecánicas

Muestra	Tamaño de poro (μm)	Potencia de láser (W)	Scan (mm)	Spacing
1	400	11	0.19	
2	500	11	0.19	
3	600	11	0.19	
4	700	11	0.19	

6.3 PRUEBAS MECÁNICAS

Para continuar con la tercera parte del proyecto a las muestras realizadas en el segundo diseño experimental, se les practicaron pruebas de resistencia a la compresión con base en la norma ASTM-D695 "*Compressive Properties For Rigid Plastics*". En esta se establece que los parámetros para el desarrollo de estas

pruebas son; Carga máxima de 10 kN, velocidad de compresión de 1.3 mm/min, máxima compresión del 50% de la muestra, que equivale a 10 mm.

Figura 7 Maquina universal de ensayos Instron, laboratorio de materiales UAO



Con los resultados de dichas pruebas se realizó un análisis estadístico con el cual se identificó cual combinación entre los parámetros de fabricación, brindaba las mejores condiciones mecánicas para la matriz tridimensional, relacionándolas con las propiedades mecánicas del hueso trabecular humano.

Habiendo identificado los parámetros más adecuados para la fabricación de la matriz, se realizaron las mismas pruebas de compresión pero esta vez se tomó una combinación fija de parámetros y se varió el tamaño de los poros. Se utilizó la misma norma ASTM –D695.

6.4 CULTIVOS CELULARES Y EVALUACIÓN DE PROLIFERACIÓN CELULAR

Finalmente en la última etapa de desarrollo experimental se llevaron a cabo una serie de pruebas de laboratorio, cultivos de células madre mesenquimales, en las cuales se tuvo como objetivo la viabilidad de las matrices fabricadas para albergar cultivos celulares y para identificar si modificar los parámetros de diseño afectan la proliferación celular. El método utilizado para la evaluación de las células se conoce como MTT, este nombre se lo da el compuesto utilizado para realizar la

tinción de las células, lo que determinará cuantas hay vivas. La primera prueba a realizar será la calibración, esta consiste en realizar cultivos con diferentes números de células para establecer el número óptimo de células que se deben colocar en el plato. Este es un paso muy importante pues si se colocan muchas células, hay una interacción no deseada lo que puede generar la muerte de las células, al igual que si hay muy pocas células pues no se tiene interacción suficiente.

Para establecer el número de células que se pueden cultivar en cada uno de los *scaffolds*. El medio de cultivo está compuesto por DMEM, esta es una solución que contiene sales, aminoácidos y vitaminas que el permiten a la célula realizar los procesos metabólicos para mantenerse viva. 10% SFB, suero fetal bovino el cual es utilizado debido a que este contiene los factores de crecimiento necesarios para que las células se reproduzcan y crezca el cultivo. Finalmente 1% PS o pen/strep, este es un antibiótico que tiene como función prevenir la contaminación de los cultivos con bacterias u otros entes externos.

Se adicionan 1500 μL de este medio de cultivo, luego se adicionan una cantidad de células determinadas, las cuales han sido contadas previamente, en cada uno de los tubos, de manera que al final se obtienen 6 tubos con 6 concentraciones celulares diferentes. Este procedimiento se realizó 4 veces para establecer una repetitividad.

Una vez realizados estos cultivos se conservaron por 24 horas a 37°C y 5% CO_2 , pasadas las 24 horas se extraen 250 μL y se mezclan para formar una solución al 0,5 mg/mL de MTT, la cual se incuba duran una hora y media. Luego se adicionan 100 μL de DMSO, un compuesto que sirve como disolvente y como criopreservante, y se coloca la mezcla en un shaker protegido a la luz por 45 minutos. Luego se realiza la lectura de la absorbancia por medio de la evaluación de la densidad óptica de la solución.

Una vez establecida la curva de calibración se dio paso a realizar los cultivos celulares en los *scaffolds*. Para estos se realizó un procedimiento muy similar al realizado para la calibración de los cultivos, se esterilizan los *scaffold* con etanol al 70% por media hora en un *shaker*, luego se realizan tres lavados con PBS por 15 minutos cada lavado en un *shaker*. Se colocan los *scaffolds* por un periodo de 15 minutos en el medio de cultivo compuesto por DMEM 10%SBF y 1%PS en un *shaker*, luego se pasa el *scaffold* a una placa de 48 pozos y se adiciona el medio

con la densidad celular elegida, lentamente sobre el *scaffold*. Después se deja el cultivo reposar por 24 horas a 37 °C y al 5% de CO₂.

Posterior a estas 24 horas, se pasa el *scaffold* con mucho cuidado a otro pozo con medio de cultivo, para permitir el crecimiento de las células en el *scaffold* y no sesgar el ensayo por el crecimiento de las células adheridas a la placa de cultivo. A las 24 horas de transferidas las células, se pasa el *scaffold* a un pozo nuevo, donde se adicionan 400ml MTT al 0,5% en DMEM durante una hora y media. Se transfiere el *scaffold* a un nuevo pozo y se adiciona DMSO puro por 45 min esto se debe realizar en un *shaker* y protegido de la luz pues el ensayo es fotosensible. Finalmente se retira el *scaffold* del *shaker* y se lee la absorbancia por medio de la densidad óptica, pues como se dijo anteriormente, las células viables interactúan con el MTT y producen formazán, el cual tiene un color azul y cambia la densidad óptica de la solución.

7 RESULTADOS Y ANALISIS

7.1 ETAPA DE DISEÑO

Los diseños se realizaron en el software SolidWorks, se diseñaron muestras con combinaciones de los siguientes parámetros, el tamaño del poro, 400 μm , 500 μm , 600 μm y 700 μm . Según el tamaño de poro utilizado se diseñaba con la cantidad necesaria de poros para lograr un 50% y 70% del volumen total ocupado por los poros. La geometría de los poros, se realizaron diseños con poros circulares y poros cuadrados, dándole a los poros cuadrados tamaño según el lado, y a los poros circulares según su diámetro. Se lograron así 16 diferentes diseños de los cuales a continuación se presentan 3 de las imágenes de estos diseños.

Figura 8 400 μm poro cuadrado 70%.

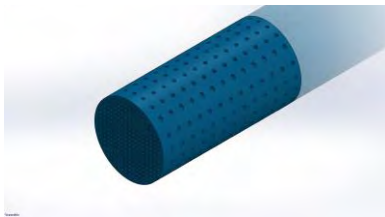


Figura 9 500 μm poro circular 70%

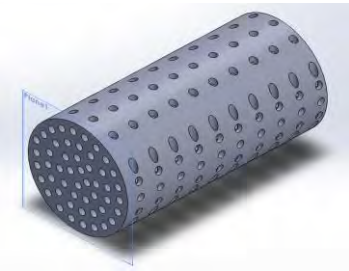
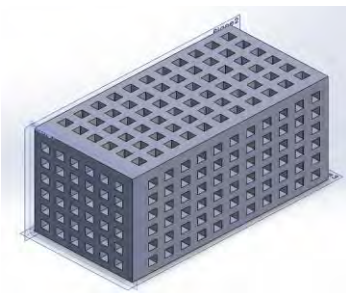


Figura 10 700 μm poro cuadrado 70%



Al fabricar los primeros *scaffolds* como pruebas del diseño realizado, se encontró que la porosidad del 50% correspondiente al volumen de los poros, es muy una porosidad muy baja para las diferentes posibles aplicaciones de una matriz para regeneración de tejido óseo⁸¹. Por esto se decidió cambiar esa variable del estudio y trabajar con porosidades de 70% y 90%.

7.2 ETAPA DE FABRICACIÓN

En las tablas 5 y 6 se presentan los resultados de las primeras muestras fabricadas, donde se utilizó tamaño de poro 400 μm y 500 μm con el fin de identificar como afectaba la variación de los parámetros en la precisión y exactitud del tamaño de poro. En la Tabla 5 se muestran los datos para poros de 400 μm , con 0,18 mm de SS y un barrido por el Lp entre 7 W y 11 W. En la Tabla 6 los datos para poros de 400 μm con 0,19 mm de SS y un barrido por Lp entre 7 W y 11 W. La Tabla 7 muestra el análisis ANOVA realizado en Excel para identificar el comportamiento de estos datos.

Tabla 4 Datos consignados de tamaño de poro 400 μm y SS=0,18 mm

Lp (W)	7 W	8 W	9 W	10 W	11 W
Número de datos	6	6	6	6	6
Sumatoria	2742.03	2571.78	2763.18	2740.78	2566.71
Promedio (μm)	457.01	428.63	460.53	456.79	427.78
Varianza (μm)	1186.12	790.29	1935.79	3593.87	2496.61
Desviacion estandar (μm)	34.44	28.11	43.99	59.95	49.96

⁸¹ KARAGEORGIOU Vassilis, KAPLAN David, (2005). Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*. 26, pp.5474 – 5491.

Tabla 5 Datos consignados de tamaño de poro 400 μm y SS=0,19 mm

Lp (W)	7	8	9	10	11
Número de datos	6	6	6	6	6
Sumatoria	2869.11	3129.6	2790.34	3216.01	3216.01
Promedio (μm)	478.18	521.6	465.05	536.01	536.01
Varianza (μm)	2050.25	6692.86	3806.51	3042.76	3042.76
Desviación Estandar (μm)	45.27	81.8	61.69	55.16	55.16

Tabla 6 Analisis ANOVA de datos consignados para 400 μm

<i>Fuente de varianza</i>	<i>SS</i>	<i>Df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>
SS	56217.7138	1	56217.7138	19.63055692	5.13168E-05
Lp	8325.828033	4	2081.457008	0.726820027	0.577831698
Interaccion	25072.63514	4	6268.158785	2.188766485	0.083664441

En el análisis ANOVA se parte de la premisa que ambos factores (Lp y SS) afectan el resultado final del tamaño del poro, esta se comprueba o se niega según el *P-value*. Si este valor es menor que 0.05 se comprueba mientras que si es mayor se niega la premisa inicial. En la Tabla 7, se aprecia que el valor de p para SS es menor a 0.05 mientras que en Lp es mayor. Esto nos indicaría que el tamaño del poro se ve influenciado por el SS y no por el Lp.

En la Tabla 5 se encuentran los resultados consignados para tamaño de poro 500 μm , 0,18 mm de SS y un barrido por Lp entre 7 W y 11 W. En la Tabla 6, se encuentran los mismos datos anteriores para 0,19 mm de SS. Finalmente en la Tabla 10 se presenta el análisis ANOVA de estos datos.

Tabla 7 Datos consignados tamaño de poro 500 μm con 0,18 mm

Lp (W)	7	8	9	10	11
Número de datos	6	6	6	6	6
Sumatoria	3195.4	3342.64	3215.99	3181.68	3388.8
Promedio (μm)	532.56	557.1	535.99	530.28	564.8
Varianza (μm)	2509.13	5027.85	3940.56	5549.91	1517.97
Desviación estandar (μm)	50.09	70.9	62.77	74.49	38.96

Tabla 8 Datos consignados tamaño de poro 500 μm con 0,19 mm

Lp (W)	7	8	9	10	11
Número de datos	6	6	6	6	6
Sumatoria	3273.18	3068.6	3091.46	3886.89	3886.89
Promedio (μm)	545.53	511.43	515.24	647.81	647.81
Varianza (μm)	5161.07	2893.21	6847.05	3064.79	3064.79
Desviación estandar (μm)	71.84	53.78	82.74	55.36	55.36

Tabla 9 Análisis ANOVA de datos consignados para 500 μm

Fuente de varianza	SS	df	MS	F	P-value
SS	12980.39	1	12980.39	3.27	0.076145674
Lp	63174.75	4	15793.68	3.99	0.006917773
Interacción	57192.11	4	14298.02	3.61	0.011571735

En las Tablas 7 y 10, se encuentra un tercer factor que es la interacción, este factor es la relación que tiene la interacción de las dos variables de control (SS y Lp) con el tamaño del poro. En la Tabla 7, no es menor a 0.05 pero si es un valor cercano y en la Tabla 10 si es menor, esto llevo a realizar un tercer análisis, esta

vez un solo factor, y analiza la relación entre el tamaño del poro y la ED suministrada a la muestra. Recordemos que la ED se obtiene de la ecuación 1.

Tabla 10 Análisis ANOVA 400 μm entre ED y tamaño de poro

ANOVA					
<i>Fuente de variación</i>	<i>SS</i>	<i>Df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>
Entre factores	86315.4472 3	9	9590.6052 48	2.51962639 4	0.01825074 1

Tabla 11 Análisis ANOVA 500 μm entre ED y tamaño de poro

ANOVA					
<i>Fuente de variación</i>	<i>SS</i>	<i>Df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>
Entre factores	97877.9999 5	9	10875.333 33	4.15313029 4	0.00048555 4

Al ver los resultados obtenidos en las Tablas 11 y 12, se puede ver que si hay una coincidencia al afirmar que la ED es un factor que tiene una relación directa con el tamaño del poro. Esto quiere decir que no se pueden analizar los factores por separado si no que es la interacción de los factores la que permitirá tener control sobre las piezas diseñadas.

Al comparar estos resultados obtenidos con los resultados de otras investigaciones, se encuentran resultados similares. En una investigación encontrada⁸², aunque utilizan valores diferentes en los parámetros de control del procedimiento, esto debido a que trabajan con un material diferente al que se está

⁸²Selective Laser Sintering of Poly(L- Lactide)/Carbonated Hydroxyapatite Nanocomposite Porous Scaffolds for Bone Tissue Engineering, Tissue Engineering Op. cit.

utilizando en la investigación aquí documentada, se encuentra un comportamiento similar. En el momento de variar la potencia del láser se llega a un punto donde la potencia es muy alta y empieza a generar que las partículas de polvo que no han sido impactadas con el láser, igualmente alcancen el punto de fusión y se sintericen con otras partículas solidificando partes que debían quedar libres de partículas⁸³.

También se encontraron algunas diferencias entre los resultados de otras investigaciones y el desarrollo de este proyecto^{84,85} aunque en todas se demuestra la relación entre el control de los parámetros de fabricación y los resultados obtenidos en cuanto al tamaño de poro, en los dos artículos mencionados, se encuentra que el tamaño de poro del producto final, es menor al diseñado en las herramientas computacionales. En las pruebas realizadas para este trabajo, siguiendo los mismos procesos de fabricación que en otros artículos, se obtuvieron tamaños de poro mayor a los diseñados en las herramientas computacionales, en todos los casos.

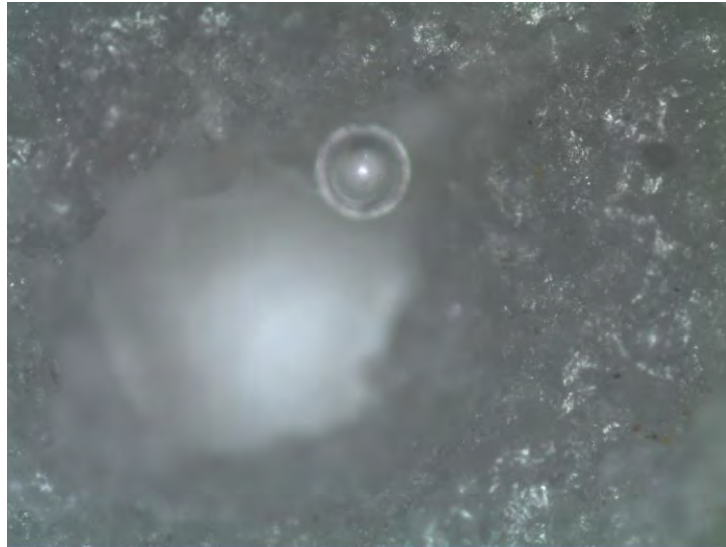
Como ya se explicó que la relación entre las variables de fabricación no se puede trabajar de manera independiente si no que deben ser tomadas en cuenta como un conjunto. Por esto para el segundo diseño experimental se decidió que se iba a trabajar con parámetros de fabricación de Lp 8 W, 9 W, 10 W, 11 W y 12 W, y SS 0.18 mm y 0.19 mm. La decisión de utilizar el parámetro Lp 12 W, en vez de 7 W, se tomó debido a que este segundo es una potencia muy pequeña que no genera una buena sinterización del material, por lo que las propiedades mecánicas se iban a ver afectadas. Esto se puede observar en la Figura 11 donde se aprecia una burbuja en un lugar donde debía encontrarse material sinterizado.

⁸³ Ibid.

⁸⁴ Ibid.

⁸⁵ Effect of process parameters on the properties of selective laser sintered Poly(3-hydroxybutyrate) scaffolds for bone tissue engineering Op. cit.

Figura 11 Burbuja en scaffold fabricado con Lp de 7 W



Otra observación que se hizo con este primer diseño experimental, fue que el proceso de sinterización láser al generar una cristalización del material, hace que este se conforme con una estructura definida, por lo que podemos ver en la Figura 12, que las partes solidas están conformadas por estructuras esféricas, esto le brinda una irregularidad a las paredes del *scaffold* lo que podría suponer un mejor agarre de las células, esto habría que estudiarlo a mayor profundidad en próximos estudios.

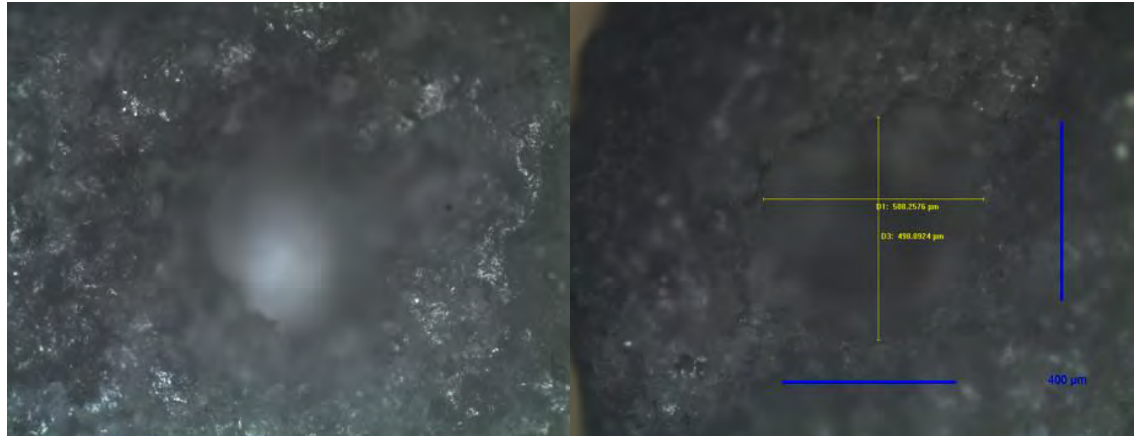
Figura 12 Estructura interna de material sinterizado



Además de esta posible ventaja, esta conformación del sólido también le da una irregularidad a la forma del poro, como se puede comprar en la Figura 13, donde podemos comparar un poro que fue diseñado de manera circular, y uno que fue diseñado de manera cuadrada, y se puede ver que no hay mayores diferencias entre estas geometrías al ser del mismo tamaño, si se trabajara con poros más grandes la diferencia podría ser más marcada, esto nos llevó a trabajar

únicamente con geometría de poro cuadrado. Cabe resaltar que en algunos poros la geometría si se ve muy bien definida, pero esto no es el comportamiento general.

Figura 13 Izquierda poro cuadrado con forma circular, derecha poro circular amorfo

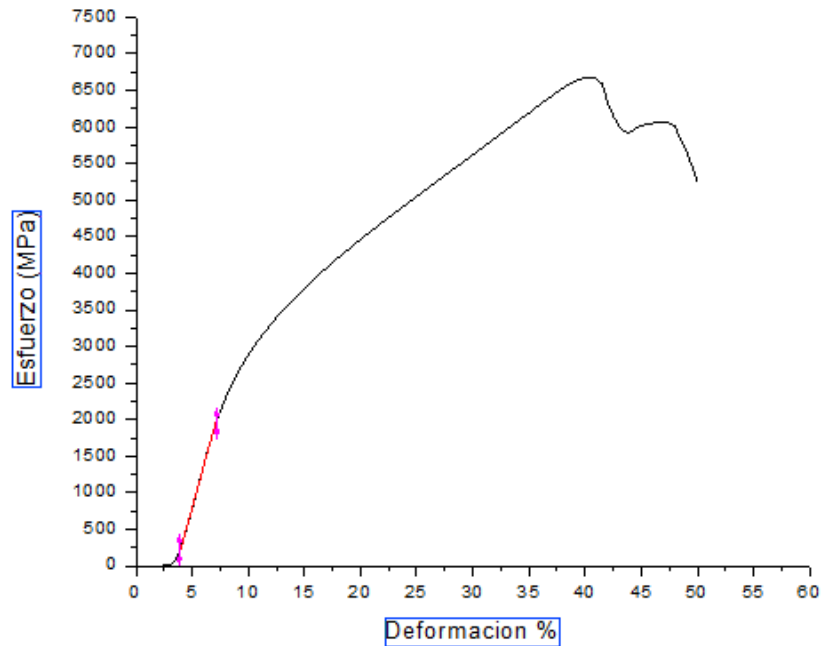


Habiendo identificado la relación de los parámetros de fabricación y el tamaño de los poros se pasó a realizar el segundo diseño experimental, este tuvo como objetivo fabricar los *scaffolds* necesarios para realizar la caracterización mecánica de estos. Con esta caracterización se buscaba identificar como los parámetros de fabricación afectaban el comportamiento del material, por lo que se realizaron pruebas según la norma ASTM-D695 “*Compressive Properties For Rigid Plastics*”. Para esta se utilizaron muestras en forma de prismas con base cuadrada de 10 mm X 10 mm y 20 mm de altura, totalmente sólidos.

7.3. CARACTERIZACIÓN MECÁNICA

Al realizar las pruebas el resultado es una serie de datos en los que relaciona la deformación creada por una carga aplicada sobre la probeta. Luego se tomaron estos datos y se llevaron al software OriginPro 8, en el cual se logró generar la gráfica de esfuerzo deformación para cada una de las muestras. Posteriormente a esta gráfica se le realizó un ajuste lineal, los datos de este ajuste se presentan en la Tabla 13, en la zona de deformación elástica, de donde se obtiene la pendiente de la recta, valor que como se dijo antes es el modulo elástico. La Gráfica 1 presenta la curva de esfuerzo deformación para una de las combinaciones de parámetros.

Figura 14 Gráfica 1, esfuerzo deformación para ensayo de compresión muestra 1, parámetros Lp 9, SS 0.18



En esta gráfica podemos ver que el comportamiento es muy similar al comportamiento descrito en la Figura 3, con la diferencia que cuando se llega al punto de resistencia máxima a la compresión la gráfica no sigue en una curva como si lo hace la figura, sino que tiene un comportamiento diferente, posiblemente por la microestructura obtenida en el proceso de sinterización láser. También es necesario resaltar que para todos los ensayos se establecieron tres límites, la fractura de la probeta, un límite de deformación equivalente al 50% del tamaño de la probeta, o sea 10 mm y un límite de carga en 10 Newton. En esta gráfica presentada se ve que la muestra alcanzó el límite de deformación, por lo que no se logra identificar el momento de la fractura de la probeta, límite que otras pruebas sí alcanzaron.

Tabla 12 Ajuste lineal realizado sobre gráfica de esfuerzo deformación

Ecuacion	$Y=a+b*x$		
R cuadrado	0.99924		
		Valor	Error Estandar
Esfuerzo (MPa)	Interceccion	-1981.01895	15.62585
Esfuerzo (MPa)	Pendiente	554.26744	2.78579

Otro punto que se logra identificar en la gráfica es el límite elástico, que este como se había dicho antes, es el punto donde el material deja de tener un comportamiento elástico y empieza a comportarse como un material plástico, que al retirar la carga no recuperara su forma original. Para identificar esto gráficamente se debe trazar una línea recta que se cruce con el eje X en el dos por ciento de la deformación y tenga una pendiente igual al valor del módulo elástico, y el punto de corte entre la curva de la gráfica y esta línea recta, será el valor del límite elástico⁸⁶. Otra manera de identificar este punto, que fue el método utilizado en este proyecto, es identificar el punto donde cambia la pendiente de la recta.

Habiendo encontrado el valor de la pendiente y el límite elástico identificado se pasó a construir una tabla con todos los valores incluyendo las 4 repeticiones de cada uno de los parámetros. Esta se presenta a continuación como Tabla 14.

Tabla 13 Resultados para límite elástico y modulo elástico según los parámetros de fabricación

Muestra	Potencia Laser (W)	Scan Spacing (mm)	Modulo Elástico	Límite Elástico (MPa)
1	8	0.18	503.674	26.18
2	8	0.18	620.664	34.16
3	8	0.18	564.084	31.02
4	8	0.18	585.784	29.16
5	8	0.19	246.202	13.98
6	8	0.19	381.46	18.62
7	8	0.19	384.588	18.87
8	8	0.19	442.032	16.43
9	9	0.18	576.068	28.96
10	9	0.18	647.706	31.68
11	9	0.18	709.506	34.46
12	9	0.18	369.884	13.06
13	9	0.19	611.182	30.06
14	9	0.19	613.972	30.51
15	9	0.19	600.076	28.95
16	9	0.19	602.676	29.01

⁸⁶ Introducción a la Ciencia de Materiales para Ingenieros. *Op. Cit.*

Tabla 14 (continuación)

17	10	0.18	525.718	16.73
18	10	0.18	476.152	21.77
19	10	0.18	409.688	14.7
20	10	0.18	299.864	10.11
21	10	0.19	736.462	35.5
22	10	0.19	764.792	35.99
23	10	0.19	785.592	36.02
24	10	0.19	731.73	35.51
25	11	0.18	765.978	37.53
26	11	0.18	788.678	38.4
27	11	0.18	680.318	23.63
28	11	0.18	703.738	22.4
29	11	0.19	902.046	37.44
30	11	0.19	763.418	36.48
31	11	0.19	813.994	36.78
32	11	0.19	850.982	37.57
33	12	0.18	840.134	41.49
34	12	0.18	863.714	39.46
35	12	0.18	882.726	39.33
36	12	0.18	824.954	38.05
37	12	0.19	903.266	45
38	12	0.19	906.49	40.61
39	12	0.19	908.89	38.83
40	12	0.19	831.972	38.51

A simple vista se puede ver que el valor correspondiente al módulo elástico se incrementa de manera directa con el crecimiento de la potencia del láser. Para lograr un mejor análisis e identificar el comportamiento del módulo elástico y la integración de las variables de control, se presenta la Gráfica 2 comparando el módulo elástico obtenido a partir del promedio de las cuatro muestras para cada combinación de parámetros. Además se llevó a cabo un análisis estadístico con el software Minitab® que arrojó los resultados que se presentan a continuación.

Figura 15 Gráfica 2, Esfuerzo vs Deformación de todas las combinaciones de parámetros realizadas

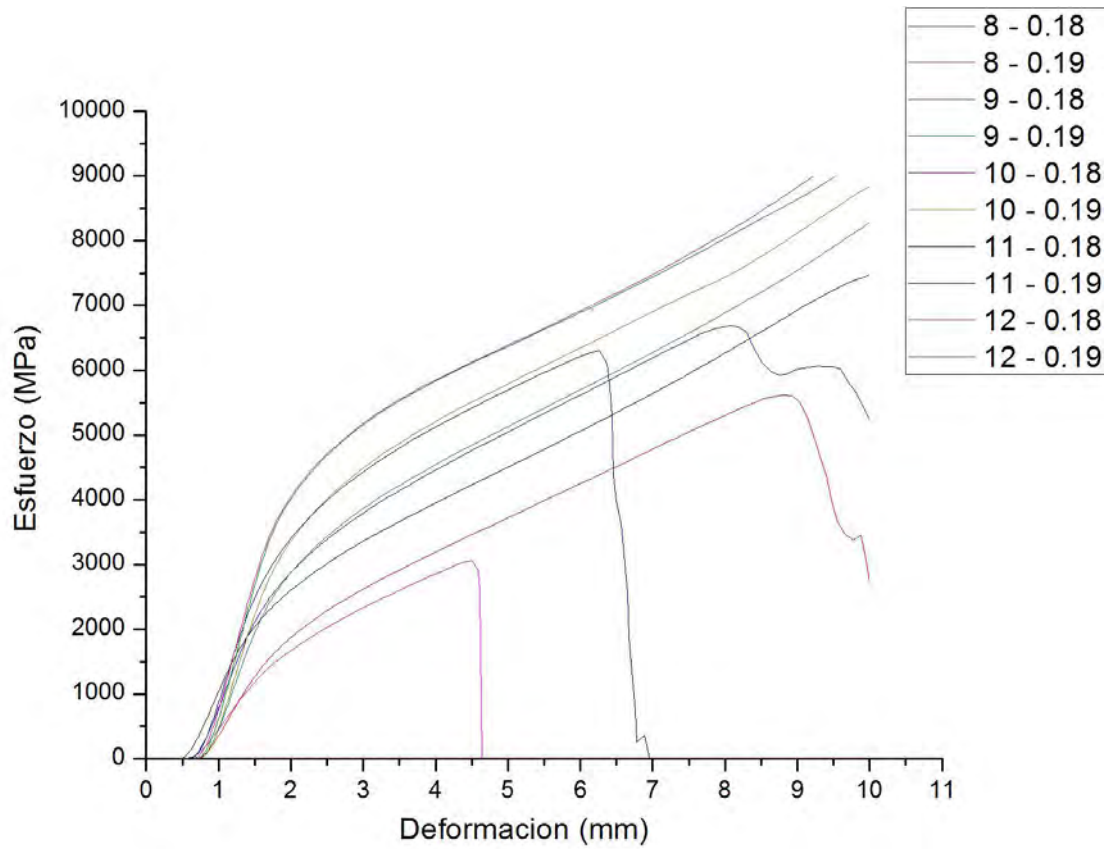


Tabla 14 Datos introducidos a Minitab

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Potencia Laser (W)	Arreglado	5	8, 9, 10, 11
Scan Spacing (mm)	Arreglado	2	0.18, 0.19

Tabla 16 Análisis de varianza para Modulo Elástico, usando Adjusted SS para Tests

Fuente	DF	Seq SS	Ajuste SS	Ajuste MS	F	P
Potencia del Láser (W)	4	852371	852371	213093	43,12	0,000
<i>Scan Spacing</i> (mm)	1	32649	32649	32649	6,61	0,015
Lp (W)*SS (mm)	4	288511	288511	72128	14,60	0,000
Error	30	148256	148256	4942	-	-
Total	39	1321788	-	-	-	-

S = 70,2985 R-Sq = 88,78% R-Sq(adj) = 85,42%

La primer prueba que se obtuvo del Minitab fue un análisis de varianza (ANOVA), en este se detectaron diferencias significativas entre los promedios del módulo elástico según los niveles de potencia, o sea que se encontró que esta variable si afecta el resultado. A su vez marcó diferencias significativas entre los promedios del módulo elástico según los niveles de SS y existe efecto de interacción para el módulo elástico dependiendo del nivel de potencia y el SS, es decir, existe una relación significativa entre el nivel de Lp y el SS, si se modifica el nivel de uno el otro se ve afectado. Estos resultados concuerdan con lo que ya se había establecido según la literatura y las pruebas desarrolladas durante la fabricación de las muestras.

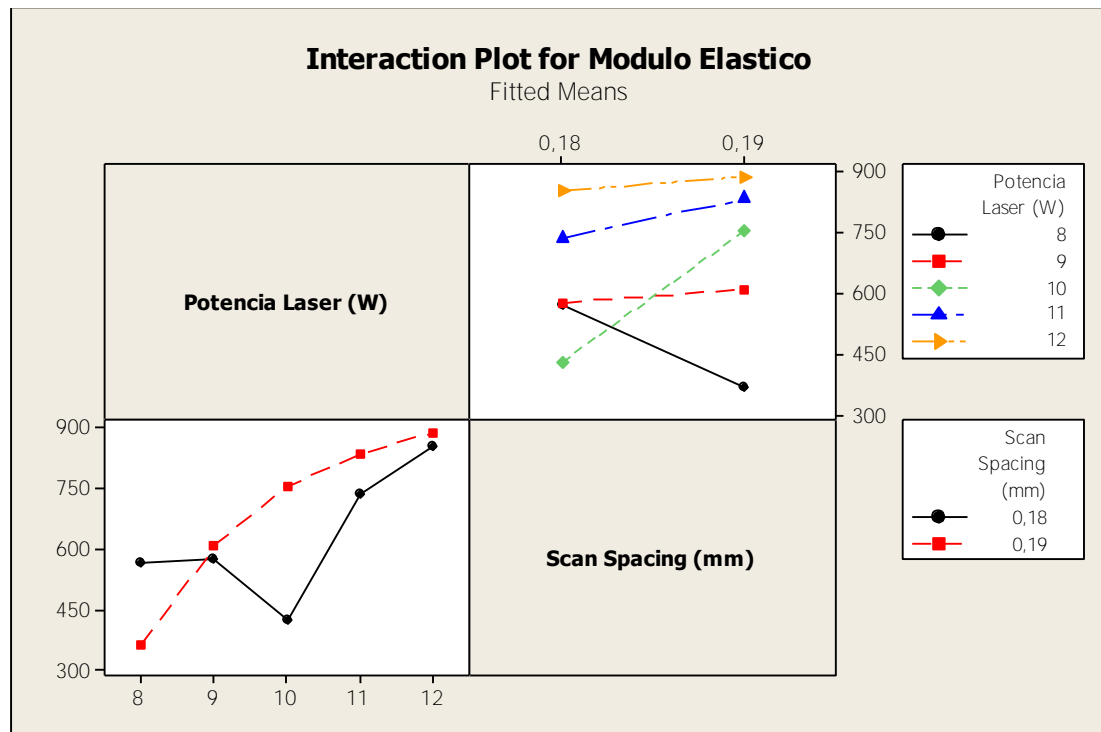
El anova explica el 85,42% de la variación del módulo elástico, el otro 14,58% es debido a otros factores no tenidos en cuenta en este modelo. Con esto podemos determinar que si utilizaron los factores que tienen mayor influencia sobre la fabricación de las muestras. Los otros factores que se pueden tener en cuenta para futuros proyectos son la velocidad del láser, la cual no se tuvo en cuenta pues había que realizar modificaciones de hardware del equipo de sinterización láser y no teníamos acceso a esto. Control sobre la temperatura, control de la velocidad del barrido del rodillo y control sobre el tamaño de partícula del material.

Luego se presenta la Gráfica 3, en la cual se muestra la interacción entre cada uno de los parámetros, Lp y SS, con el modulo elástico, conocida esta prueba como prueba de Tukey, en el eje Y se encuentra el valor del módulo elástico en Mpa y en los eje X los valores de Lp y SS como está indicado en la gráfica.

En esta gráfica podemos realizar varias observaciones, la primera es corroborar lo que ya se había observado en las gráficas y tablas anteriores y es que vemos que tanto el Lp como el SS, tienen una influencia en el módulo elástico y que esta es

directa. También se logra observar comportamiento atípico en ambas gráficas, en la de abajo a la izquierda, donde se grafica el SS según el Lp y el modulo elástico, se puede ver que para un SS de 0.18 mm y Lp de 10 W el resultado no sigue la tendencia de la gráfica. Al igual que el comportamiento en la gráfica superior izquierda, donde se grafica el Lp según el SS y el modulo elástico, en donde para un Lp de 8, el comportamiento es opuesto que para el resto, pues disminuye el modulo elástico cuando aumenta el SS. Es muy posible que estas variaciones sean errores al realizar la toma de datos, pero valdría la pena en próximas investigaciones, extender el análisis de estas muestras para identificar si hay algún cambio en la conformación del material que esté generando este cambio de comportamiento.

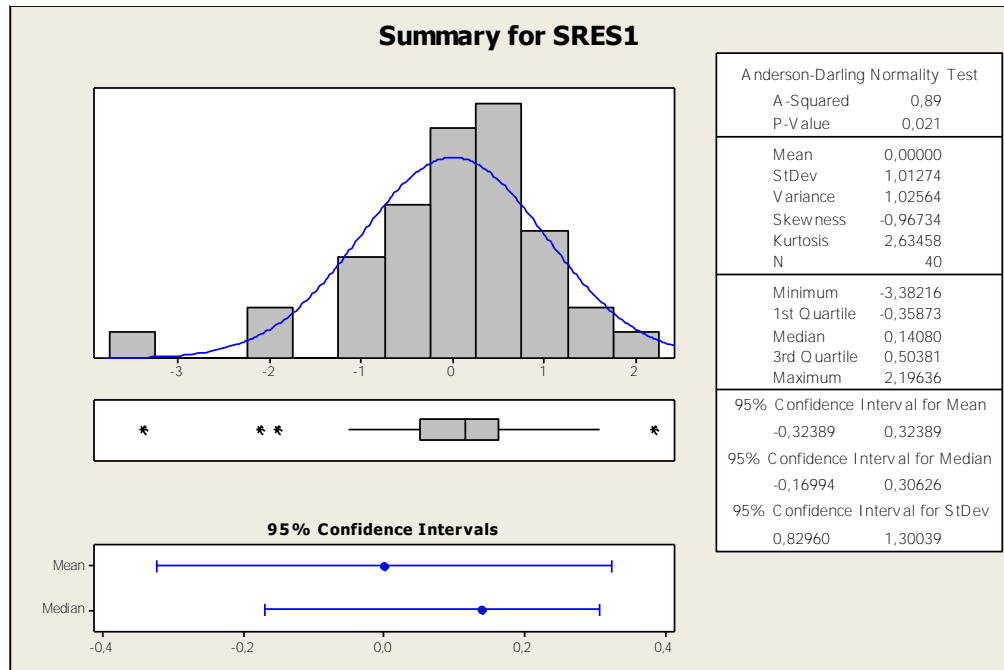
Figura 16 Gráfica 3 Interacción del módulo elástico



Finalmente se puede ver que el comportamiento que tiene la curva de Lp, abajo a la izquierda, son curvas exponenciales de manera que estas tienden a tener un límite, lo cual tiene una explicación lógica pues el módulo elástico es dependiente del material que se esté utilizando, a pesar que se pueda controlar por medio de la técnica de fabricación. Entonces para concluir, según los resultados de estas pruebas, las pruebas de comparación de medias al 95%, para maximizar el módulo elástico las condiciones óptimas deben ser a 0,19 *scan spacing* con potencia de 11 o 12 watts, obteniendo un módulo elástico de 832.6 (0,19 mm y 11 W) Y 887,7 (0,19 mm y 12 W).

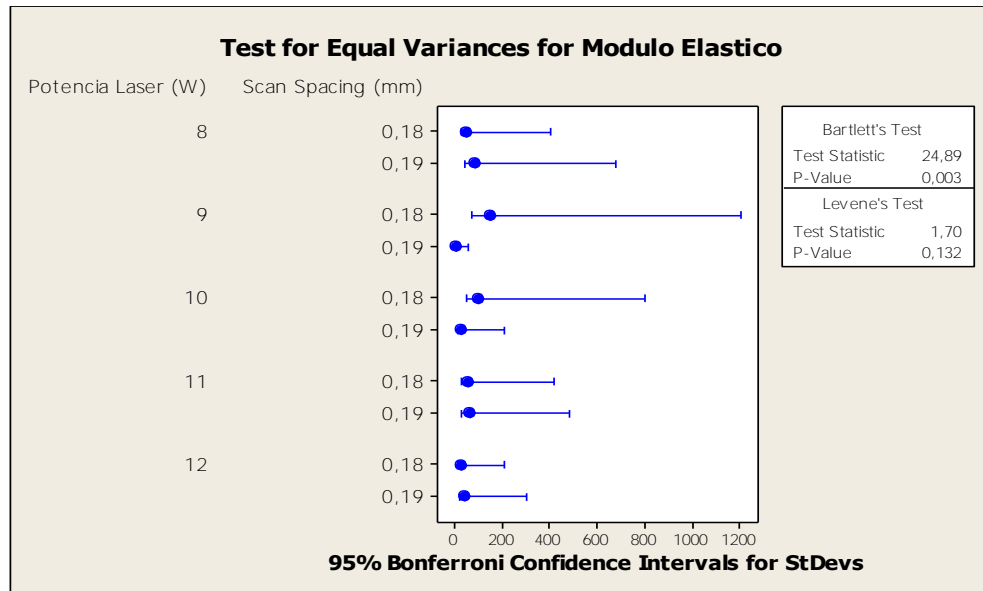
Las Gráficas 4 y 5 son generadas por el programa Minitab, donde se muestra que los datos obtenidos cumplen con dos supuestos estadísticos lo que le da validez y credibilidad a los resultados obtenidos en el estudio. En la Gráfica 4 se muestra que la distribución de los datos cumple con una distribución normal y cumple con un nivel de confianza en un 99%.

Figura 17 Gráfica 4 Supuesto de normalidad



En la Gráfica 5 se muestra que se cumple con el supuesto de igualdad de varianzas, este quiere decir que la varianza de los datos es igual hacia los dos lados de la gráfica. De esta misma se obtiene el supuesto de aleatoriedad e independencia, el cual indica que los datos son aleatorios y no tienen relaciones entre ellos.

Figura 18 Gráfica 5, Supuesto de varianza, aleatoriedad e independencia



Finalmente se generaron dos gráficas más en las cuales se hace explicita la relación de las tres variables, modulo elástico, potencia de láser y *scan spacing*. En la Gráfica 6 podemos ver de acuerdo a la intensidad del color verde como se aumenta el valor del módulo elástico a medida que aumentan los valores de Lp y SS ubicados en los dos ejes de la gráfica, logrando un valor máximo de 829 Mpa cuando se utiliza Lp 11 W y SS 0.19 mm. Este valor puede ser aún mayor según lo que se ve en la tendencia del comportamiento en la Gráfica 3. En la Gráfica 7 se puede corroborar este resultado por medio de una gráfica de superficie en la cual se genera la superficie a partir de 3 ejes.

Figura 19, Gráfica 6, Contorno módulo elástico

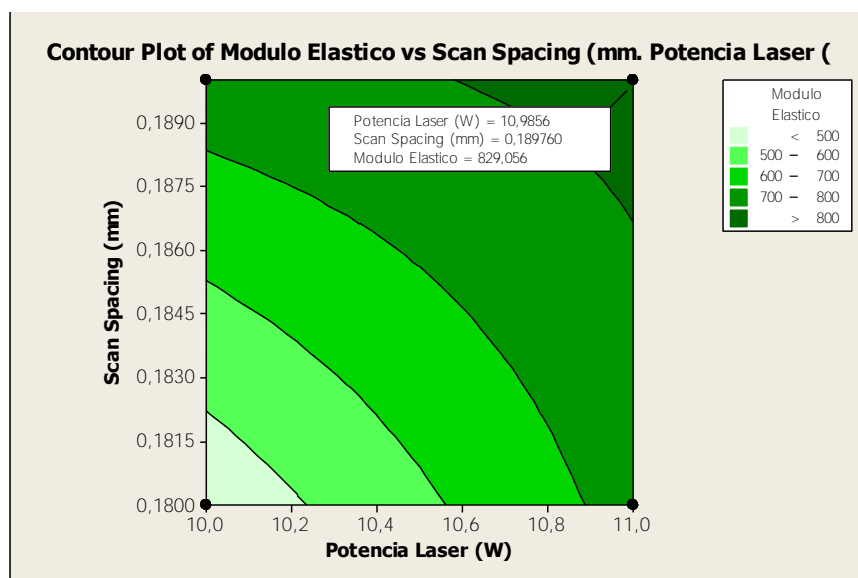
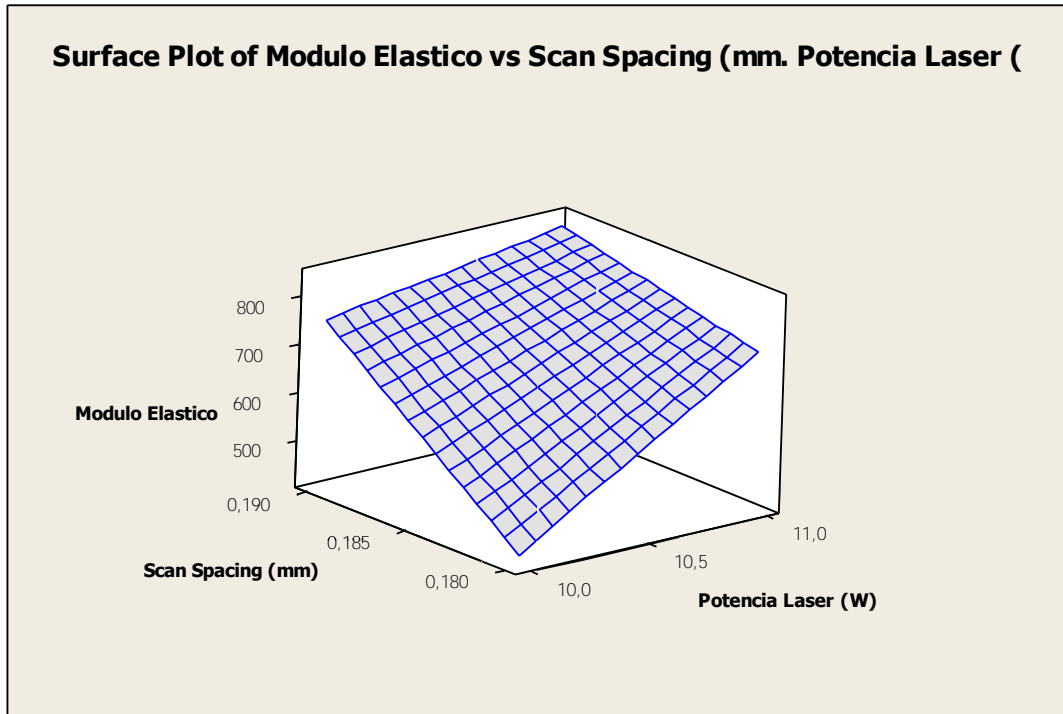


Figura 20 Gráfica 7, Superficie modulo elástico



Al realizar una comparación entre los datos obtenidos en la literatura para el hueso humano y los datos obtenidos para las muestras realizadas en este proyecto, se puede ver que el modulo elástico obtenido es un poco más bajo que el presentado, por ejemplo, en la Figura 3, pero se obteniendo unos parámetros que se acercan a 1 GPa, de manera que utilizando unos parámetros un poco más altos en cuanto a Lp y SS, se podría lograr características del material más cercanas a la del hueso humano, y al implantar células en los poros y que se genere un tejido en este se podría lograr un buen hueso.

Luego se realizó el mismo estudio para el límite elástico, y a continuación se presentan los resultados de este.

Tabla 15 Análisis ANOVA para límite elástico

Source	DF	Seq SS	Ajuste SS	Ajuste MS	F	P
Potencia del Láser (W)	4	1432,26	1432,26	358,06	16,39	0,000
Scan Spacing (mm)	1	116,93	116,93	116,93	5,35	0,028
Lp (W)*SS (mm)	4	1126,03	1126,03	281,51	12,89	0,000
Error	30	655,31	655,31	21,84		
Total	39	3330,52				

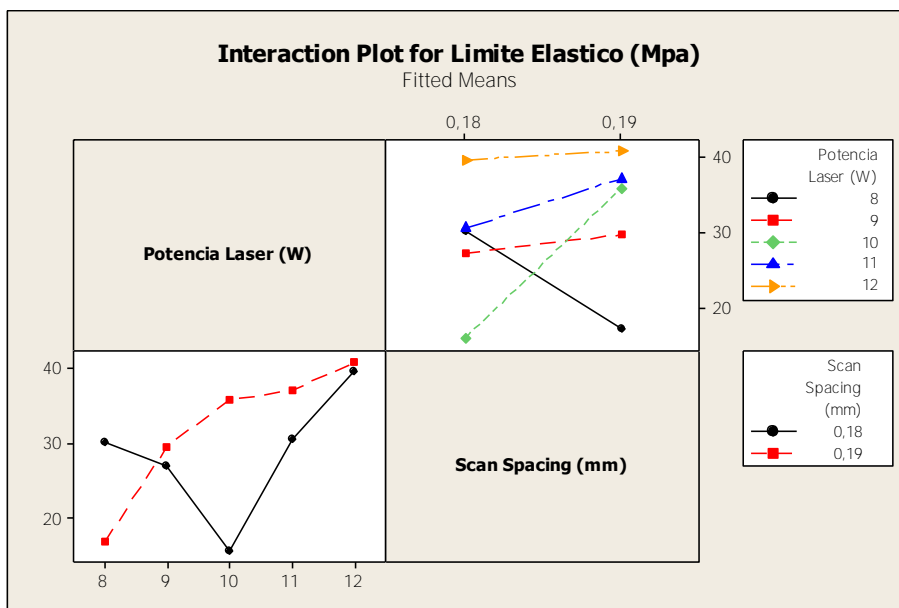
S = 4,67371 R-Sq = 80,32% R-Sq(adj) = 74,42%

En el análisis de varianza del Minitab se detectaron diferencias significativas entre los promedios del límite elástico según los niveles de potencia, o sea que se encontró que esta variable si afecta el resultado. A su vez marcó diferencias significativas entre los promedios del límite elástico según los niveles de SS y existe efecto de interacción para el límite elástico dependiendo del nivel de potencia y el SS, es decir, existe una relación significativa entre el nivel de potencia y el SS, si se modifica el nivel de uno el otro se ve afectado. Estos resultados concuerdan con lo que ya se había establecido según la literatura y las pruebas desarrolladas durante la fabricación de las muestras.

El anova explica el 80,32% de la variación del módulo elástico, el otro 19,68% es debido a otros factores no tenidos en cuenta en este modelo. Con esto podemos determinar que si utilizaron los factores que tienen mayor influencia sobre la fabricación de las muestras. Los otros factores que se pueden tener en cuenta para futuros proyectos son los mismos que se mencionaron anteriormente para el módulo elástico.

Al igual que para el módulo elástico, se realizó la prueba de Tukey en la cual se puede ver el comportamiento del límite elástico al relacionarlo con la potencia del láser y con el SS. En esta ocasión también se puede ver que existe un comportamiento con una tendencia a incrementar el límite elástico a medida que aumentan las variables. También se encontró el mismo comportamiento que es contrario a la tendencia en las mismas muestras, potencia de láser 8 W en la gráfica superior derecha tiene una pendiente negativa, contrario al resto de los valores de la variable. Mientras que para el SS 0.18 mm cuando se relaciona con la potencia de 10 W, cambia por completo la tendencia de la gráfica reduciendo el valor del límite elástico con respecto a los valores anteriores, y no incrementándolo como si sucede con la curva generada por los valores de SS 0.19.

Figura 21, Gráfica 8, Interacción límite elástico



Según los resultados presentados en la Gráfica 8, se encontró que el mayor valor del límite elástico las condiciones óptimas deben ser a 0,19 scan spacing con potencia de 11 o 12 watts, obteniendo un límite elástico de 37.07 MPa (0,19 mm y 11 W) y 40.74 MPa (0,19 mm y 12 W).

En la Gráfica 9, se pasó a validar los supuestos de validez de estas muestras, obteniendo que no cumple con el comportamiento de distribución normal, en un nivel de confianza del 99%. Esto se puede ver en la gráfica pues se ve que no hay una disminución constante y homogénea de los valores a medida que se alejan de la media. Por su parte en la Gráfica 9, se muestra que no se cumple con el supuesto de igualdad de varianzas, ya que en esta se ve que no hay un patrón de comportamiento entre los residuales, lo que indica que no hay una distribución equitativa de la varianza. Finalmente el supuesto de aleatoriedad e independencia tampoco se cumple.

De esto podemos concluir, que para realizar una evaluación del límite elástico se debe realizar una toma de valores con mayor precisión y exactitud que la que se hizo, además de tomar un número mayor de valores, para poder lograr una conclusión, pues se encontró que hay una relación entre las variables de control y el valor del límite elástico, pero estos datos no tienen una validez estadística, por lo que no son útiles para realizar una conclusión que tenga certeza.

Figura 22, Gráfica 10, Distribución de límite elástico

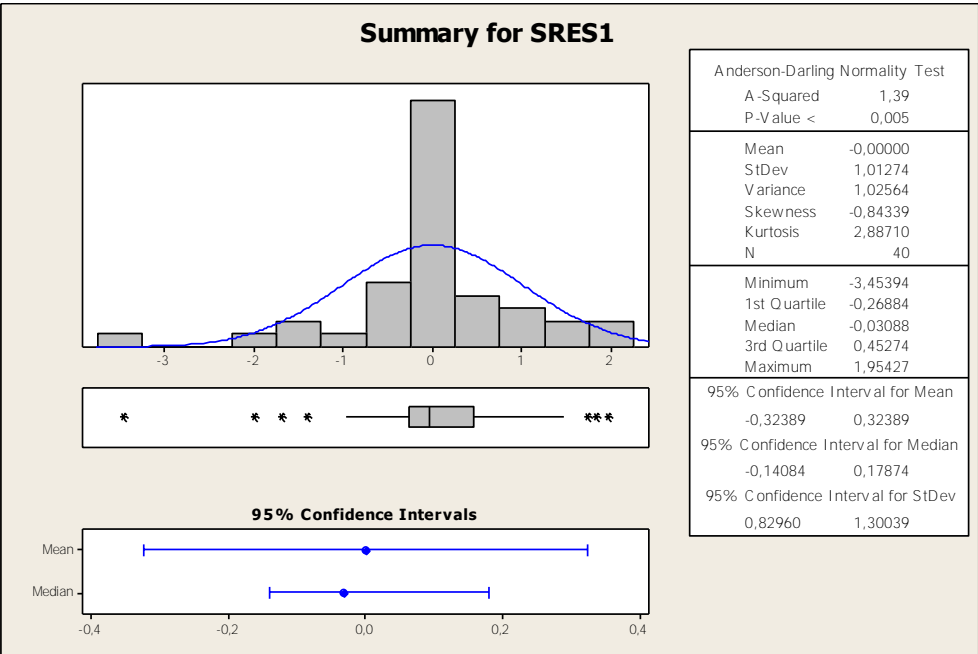
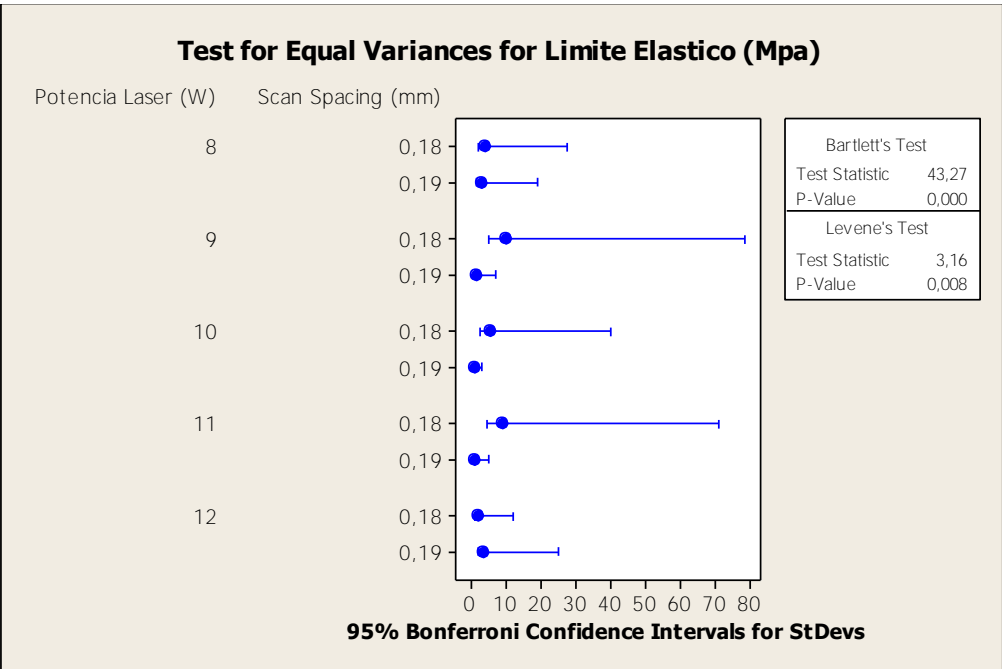
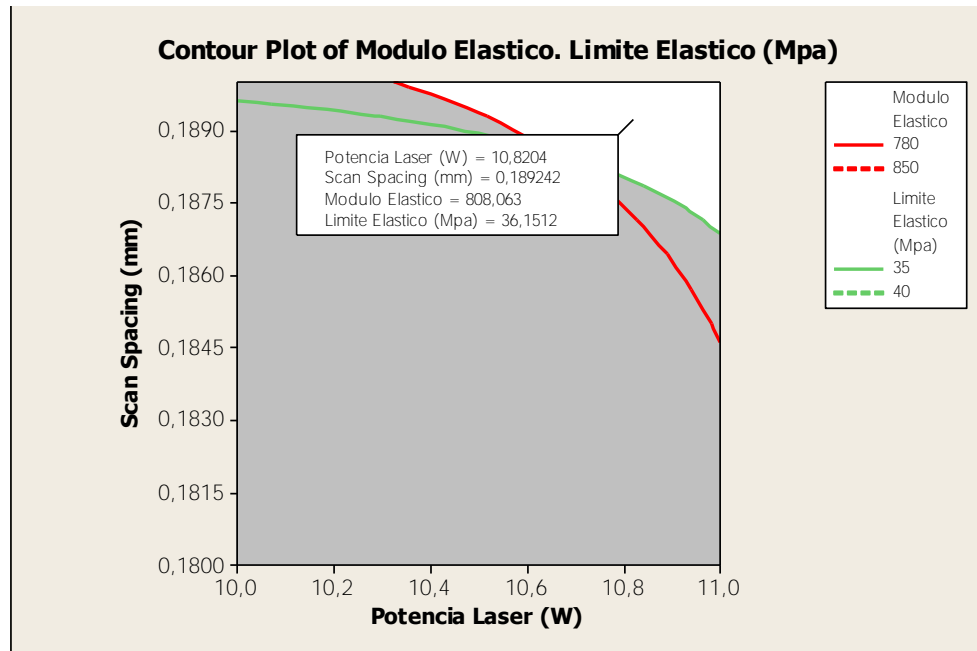


Figura 23, Gráfica 9, Validación supuesto de varianza



Al no tener una validez de los datos del límite elástico, no se generó ninguna gráfica que mostrara el comportamiento de este valor a razón del comportamiento de las variables. Lo que si se realizo fue una gráfica generando una correlación de lo encontrado para el módulo elástico y para el límite elástico, a razón del cambio de las variables de control Lp y SS, lo cual es presentado en la Gráfica 11.

Figura 24, Gráfica 11, Relación módulo elástico y límite elástico



En la Gráfica 11 podemos ver que al realizar una sobre posición de los resultados de límite elástico y módulo elástico, se encontró que estas tienen una zona en común, en relación a las variables de control, donde se puede maximizar dichas propiedades del material. El valor con el que se logran las mejores características es utilizando 11 W Lp y 0.19 mm SS, con los que la muestra alcanza un límite elástico de 36,11 MPa y el módulo elástico alcanza un valor de 808,63 MPa. Habiendo identificado los valores donde se logra maximizar las propiedades mecánicas para asimilar a las del hueso, se pasó a realizar un cultivo de células madre mesenquimales en un *scaffold* con esas características de fabricación.

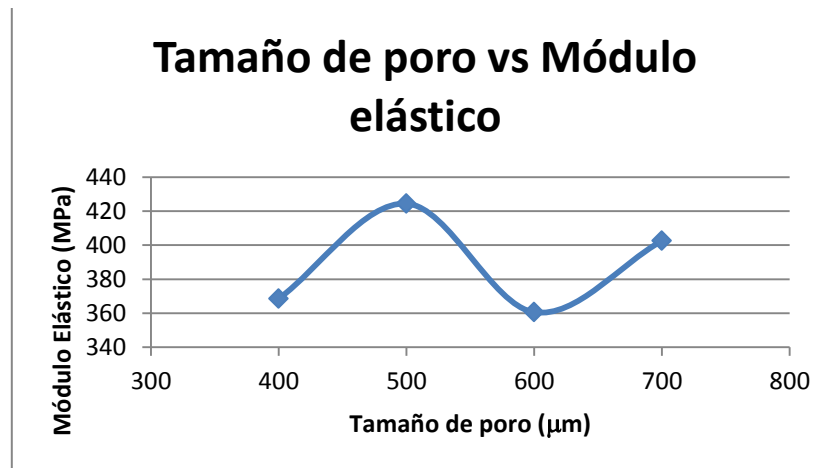
Después de identificar los parámetros de fabricación para lograr las propiedades más similares a las del hueso trabecular humano, se dio paso a realizar las mismas pruebas mecánicas a muestras fabricadas con 11 W de Lp y 0,19 mm de SS, variando el tamaño de los poros.

Tabla 16 Datos obtenidos para pruebas mecánicas con $L_p=11$ W y $SS=0,19$ mm

Muestra	Tamaño de poro (μ m)	Módulo Elástico	Límite Elástico (Mpa)
1	400	371,78	18,16
2	400	380,8	17,82
3	400	370,29	18,68
4	400	351	21,85
5	500	370,28	17,08
6	500	453,27	21,64
7	500	459,57	16,26
8	500	414,53	18,9
9	600	369,21	17,07
10	600	322,03	15,48
11	600	357,81	16,46
12	600	393,25	17,12
13	700	360,48	16,78
14	700	407,02	18,34
15	700	390,75	17,75
16	700	452,09	19,08

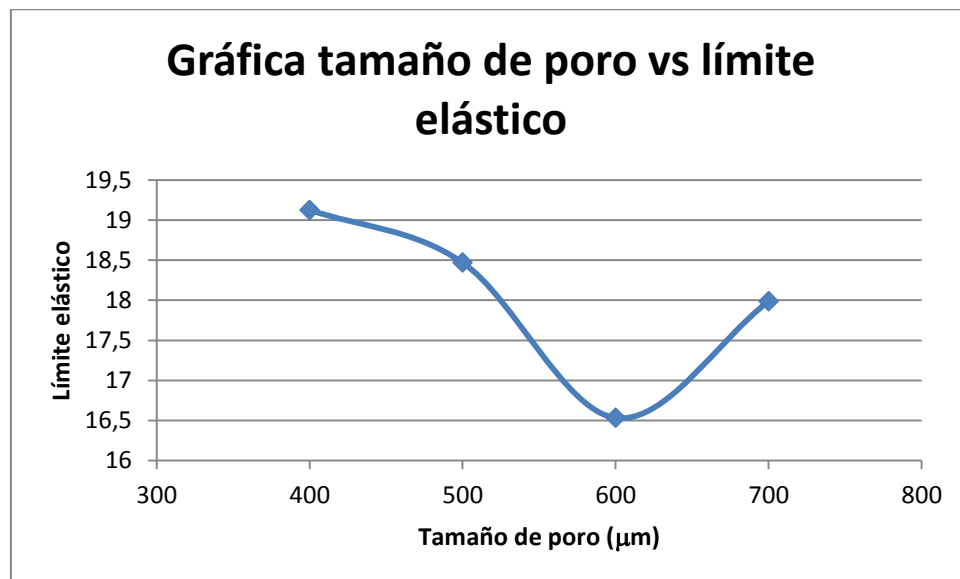
A partir de los resultados obtenidos se realizaron gráficas para identificar el comportamiento del módulo elástico según la variación del tamaño del poro, esperando encontrar una relación inversa. Para esta se trabajó con los promedios obtenidos de los 4 ensayos realizados a cada tamaño de poro.

Figura 25 Gráfica 12, Generada en Excel a partir de datos obtenidos en pruebas mecánicas de compresión para módulo elástico



En los resultados generados por la Gráfica 12 se puede ver que hay un patrón de comportamiento, pero no es un resultado lógico, ya que a medida que aumenta el tamaño de poro el comportamiento del módulo elástico es variable.

Figura 26, Gráfica 13, Generada en Excel a partir de datos obtenidos en pruebas mecánicas de compresión para límite elástico



Al realizar la misma gráfica para el límite elástico también se encontró que el comportamiento no era un comportamiento normal, aunque en un principio parece tener una tendencia a disminuir a medida que aumenta el tamaño de poro, al final se presenta lo contrario. Se piensa que esto puede haber ocurrido debido a que se

tuvo problemas con la limpieza de los *scaffolds* de manera que en algunos de estos puede que se encontrara polvo en las cavidades de los poros.

Por estos motivos se decidió que no se continuaría a realizar todo el análisis estadístico que fue realizado a las otras pruebas mecánicas ya que no tiene sentido trabajar con unos datos que no van a cumplir con los supuestos estadísticos.

7.4 CULTIVOS CELULARES Y PRUEBAS DE PROLIFERACIÓN CELULAR

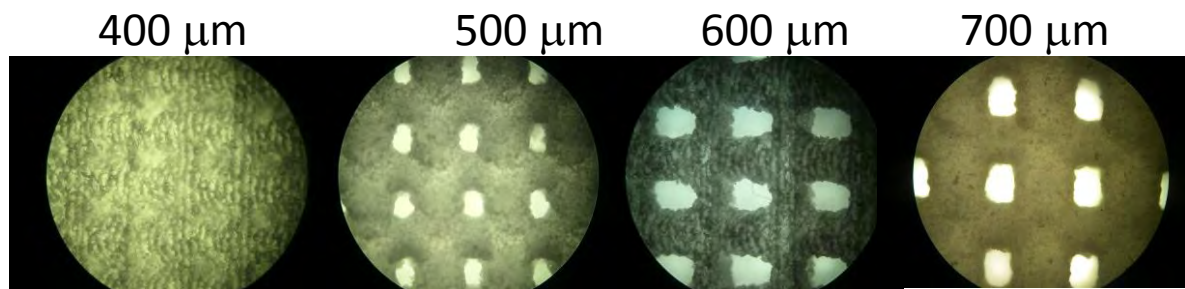
Para llevar a cabo esta cuarta y última etapa del proyecto se llevó a cabo la fabricación de los *scaffolds* con poros cuadrados de 400 μm , 500 μm , 600 μm y 700 μm , con porosidades del 70% y 90%, con potencia de láser de 11 W y *scan spacing* 0.19 mm. Al realizar este procedimiento encontramos varios inconvenientes, el primero de ellos fue que al realizar la impresión de todas las muestras con 90% de porosidad, las partes solidas eran demasiado delgadas, y por los parámetros de fabricación quedaban demasiado frágiles y se dañaban en el proceso de extracción y limpieza. Por lo que de este punto en adelante se siguió trabajando únicamente con las muestras al 70%.

El segundo inconveniente que se tuvo fue el proceso de limpieza, este proceso es necesario debido a que por el método de fabricación, en la parte interna del *scaffold* se encuentra mucho material que no fue sinterizado, pero queda atrapado, y es necesario retirarlo. Para hacer esto se utilizan varios métodos, el más común es conocido como *sand blasting* este consiste en aire comprimido, que a su vez tiene unas partículas de arena de un tamaño muy pequeño, menor a las 30 μm que tienen las partículas del Nylon utilizado para la sinterización láser, estas partículas chocan contra el material atrapado y hacen que este se desprenda, sin causar daños a la estructura que si esta sinterizada.

Después de realizar el proceso no había salido todo el material por lo que se buscó otros métodos de limpieza como agua a presión entre otros fluidos a presión, pero ninguno resulto diferente al *sand blasting*. A partir de esto se empezó a buscar una manera de extraer el material con un medio sólido, algo lo suficientemente pequeño que atravesara los poros, pero lo suficientemente duro para retirar el material, lo único que se logró encontrar fue fibra óptica, lastimosamente esta solamente pudo pasar por los poros de 600 μm y 700 μm , de manera que fueron estos los que se utilizaron para las pruebas a nivel celular. No

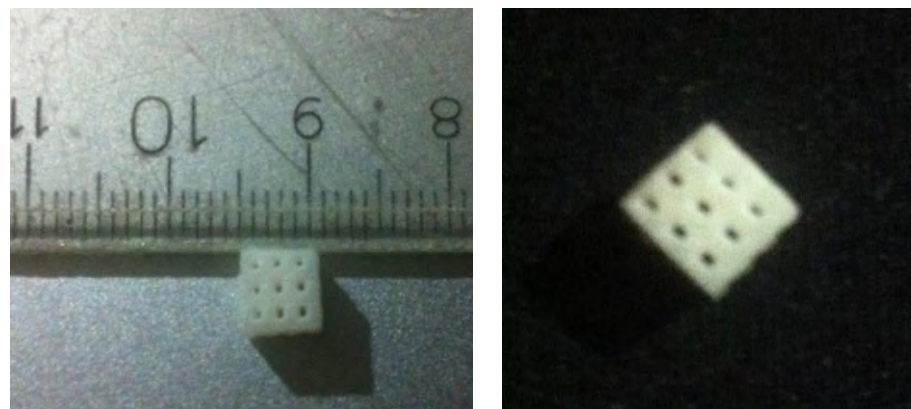
se intentó realizar los cultivos en las muestras con poros de 400 μm y 500 μm , pues como se ha visto en la literatura, uno de los factores más importantes es la interconectividad de los poros, y este material atrapado en el medio no permitiría dicha interconectividad. En la Figura 27, se pueden ver las fotos tomadas a través del microscopio a las *scaffolds* resultantes, donde se muestra que los poros de 400 μm están totalmente tapados, para 500 μm no se puede apreciar pues los poros en la superficie están bien, como se muestra en la imagen pero en la parte interna se encuentra material que no se logró retirar.

Figura 27 Imágenes de los poros superficiales de los scaffolds fabricados para cultivos celulares



Finalmente entonces se realizaron 32 muestras cubicas de 5 mm de lado con tamaño de poro 600 μm y 32 más del mismo tamaño con tamaño de poro 700 μm , todas con 70% de porosidad, utilizando Lp de 11 W y SS de 0.19 mm. En la Figura 28 se muestran estas *scaffolds* mencionadas.

Figura 28 Scaffolds fabricados para cultivos celulares



Posteriormente se pasó a hacer la prueba de calibración, en la Tabla 19 se presentan las concentraciones utilizadas, en la columna 5 dice Blanco, pues este es el medio de cultivo sin células para que sea utilizado como medio de control para la absorbancia.

Tabla 17 Concentraciones utilizadas para curva de calibración

	1	2	3	4	5
A	2.000	2.000	2.000	2.000	Blanco
B	4.000	4.000	4.000	4.000	Blanco
C	8.000	8.000	8.000	8.000	Blanco
D	16.000	16.000	16.000	16.000	Blanco
E	32.000	32.000	32.000	32.000	Blanco
F	64.000	64.000	64.000	64.000	Blanco

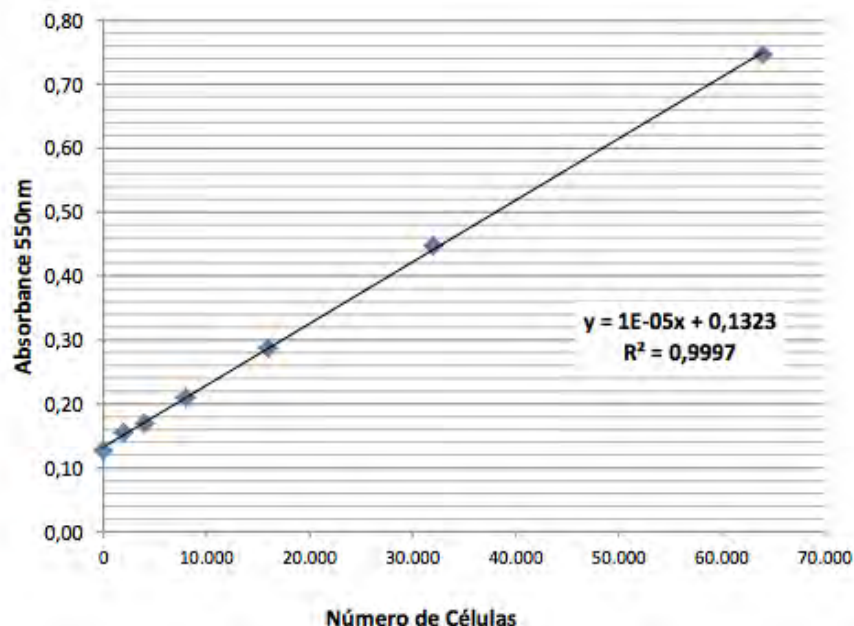
De los resultados obtenidos en la Tabla 19, se pueden ver todos los datos obtenidos para la absorbancia de cada uno de los ensayos realizados, con estos resultados se construyó la Tabla 20, la cual presenta el promedio de absorbancia obtenido, promedio de las filas de la Tabla 19, y su correspondencia al número de células cultivadas en cada ensayo.

Tabla 18 Tabla de promedios de absorbancia de células en scaffold

[] Células	Absorbancia a 550 nm
0	0,12717
2.000	0,15475
4.000	0,16950
8.000	0,20950
16.000	0,28675
32.000	0,44725
64.000	0,74650

Con los resultados de la Tabla 20, se realizó una gráfica en el software Excel, a la que luego se le realizó un ajuste lineal en el cual se obtiene el coeficiente de correlación, el cual determina la relación entre el número de células cultivadas y la cantidad absorbida por el *scaffold*.

Figura 29, Gráfica 14, Curva de calibración



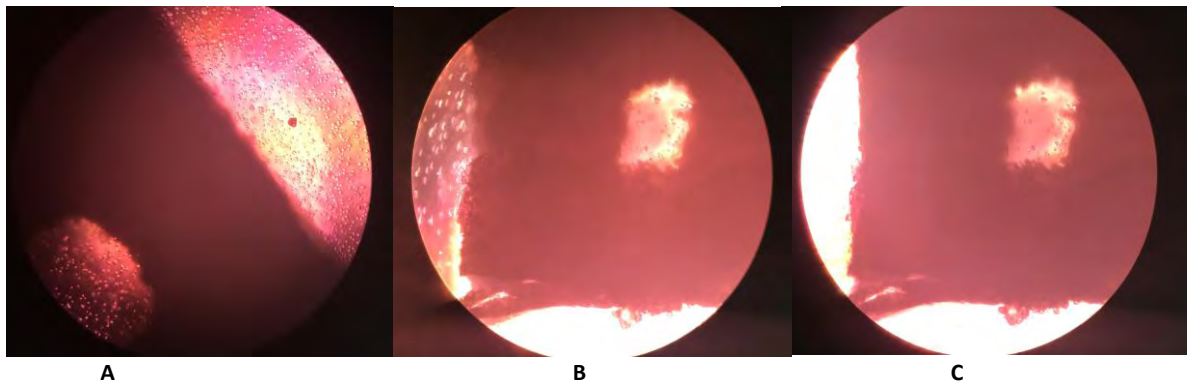
En la Gráfica 14 se puede ver que el ajuste lineal es casi exacto sobre los resultados obtenidos en las muestras, lo cual se ratifica con el valor R^2 que es el coeficiente de correlación. Esta recta trazada se denomina curva de trabajo, indica las concentraciones óptimas a utilizar para encontrar una relación lineal entre la concentración y la absorbancia, lo que brinda soporte estadístico a los resultados obtenidos⁸⁷.

Los resultados obtenidos en este proceso, lastimosamente, no fueron los resultados esperados. Al realizar las pruebas con los *scaffolds* con poros de 600 μm y 700 μm , con diferentes densidades celulares, se encontró buena absorbancia al igual como se había encontrado en las pruebas de calibración, pero no se logró determinar ninguna diferencia relacionada con el tamaño del poro. En la Figura 30 se muestra el *scaffold* con el medio de cultivo, en esta se pueden ver tres imágenes tomadas al mismo *scaffold* en tres momentos de tiempo diferente. En estas tres imágenes se puede identificar la buena absorbancia y la interacción entre el *scaffold* y las células.

⁸⁷ HENAO Luis Eduardo, DUARTE Martha, AGREDA Jesus Alberto, GOMEZ Fernando. (2003). Química Analítica II, Capítulo 4: Establecimiento de un Método Espectrofotométrico. [En línea] Disponible en: http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ciencias/2001184/lecciones/Cap10/01_01_01.htm. [Último acceso: Abril 10, 2014]

En la imagen del lado izquierdo (A), se muestra el momento inicial de cuando se colocó el *scaffold* con el medio de cultivo en la placa, luego en la imagen en el centro (B) se tomó la imagen 24 horas después cuando se trasladó el *scaffold* a otro plato para evitar el sesgo del ensayo, finalmente la imagen del lado izquierdo (C) se tomó en el momento final antes de realizar la evaluación de la densidad óptica.

Figura 30 Fotos tomadas con microscopio de un *scaffold* de 600 μm , embebidos en el cultivo celular, avance en el tiempo



En la Figura 30 se muestra la absorbancia del *scaffold*, en la imagen A se puede apreciar la cantidad de medio de cultivo que rodea todo el *scaffold*, luego en la imagen B se reduce la cantidad de medio de cultivo, y se empieza a ver como se modifica la superficie externa del *scaffold* donde se adhiere una capa de células, finalmente en la imagen C, se puede ver que en la parte exterior al *scaffold* hay muy poco medio de cultivo, el cual si está presente en el poro. Al comparar las imágenes B y C, en la parte inferior izquierda de cada imagen, se puede ver que la capa de células que se adhiere se ha incrementado lo que indica que si hay una buena interacción entre las células, el material y la microestructura del *scaffold*.

8 CONCLUSIONES

A partir de los resultados y el análisis realizado en este trabajo se logró:

- Fabricar una estructura tridimensional utilizando la técnica de sinterizado láser, que permitió estudiar los efectos de las características de fabricación, de dicha técnica, en la proliferación celular y las características del *scaffold* resultante.
- Se diseñaron diferentes estructuras de *scaffolds*, que al ser fabricadas con la técnica de sinterización láser, permitió identificar cuáles eran los alcances de dicha técnica en cuanto a la libertad de diseño con relación a los parámetros de fabricación, teniendo en cuenta la precisión de la impresión en escalas micrométricas.
- Se lograron obtener una serie de *scaffolds* por medio de la técnica de sinterización láser, con diferentes parámetros de fabricación que permitían la obtención de *scaffolds* con poros de 400 μm , 500 μm , 600 μm y 700 μm , que posteriormente podrían ser cultivados con células.
- Se determinaron las propiedades de resistencia a la compresión de los *scaffolds* por medio de ensayos de compresión en la maquina universal de ensayos Instron de la Universidad Autónoma de Occidente, en los cuales se encontró que los parámetros de fabricación Lp y SS del proceso de sinterización láser tienen una influencia directa sobre el módulo elástico. Además se encontró que, entre los parámetros utilizados, en este proyecto, para la fabricación de los *scaffolds* se logró maximizar el módulo elástico a 829 MPa acercándolo al módulo elástico del hueso humano de 1200 MPa, encontrado en la literatura.
- Se implantaron células madre en dos diferentes diseños de *scaffolds* en los cuales se logró identificar la buena absorbancia y la viabilidad que tiene el *scaffold* para albergar las células, además del buen agarre que permite la microestructura del sinterizado láser.

9 RECOMENDACIONES

Para dar continuidad al proyecto y el proceso de investigación de las características del proceso de sinterización láser para fabricar *scaffold* para cultivos celulares se deben tener en cuenta varios hallazgos de este proyecto.

Primero, ampliar el rango de trabajo de los parámetros de fabricación de manera que se puedan obtener mejores características mecánicas, logrando valores más cercanos al módulo elástico del hueso humano y lograr mejores características de poros, en cuanto a la exactitud de la geometría y las dimensiones, brindando un estudio más amplio a cerca de la proliferación celular.

Segundo, utilizar un mayor número de variables entre los parámetros de fabricación, se sabe que hay otros parámetros de fabricación que afectan el resultado de las impresiones por sinterizado láser, entre estos esta la velocidad del rodillo, la temperatura de la materia prima y los gradientes de temperatura durante el proceso. El control de estos parámetros permitirá tener mayor control sobre los resultados finales.

Tercero, mejorar el método para la limpieza de los *scaffolds* que permita lograr buena interconectividad entre los poros más pequeños, lo que permitiría mejorar el estudio de cultivos celulares e identificar como el tamaño y la geometría de los poros afecta el agarre de las células al *scaffold* y la proliferación celular.

Cuarto, realizar investigaciones similares con otros materiales que permitan utilizar otros parámetros para la fabricación, con rangos más amplios de fabricación, por ejemplo el PLA (ácido poli-láctico) con el cual se ha logrado en otras investigaciones poros de 250 μm con este mismo proceso de fabricación.

BIBLIOGRAFIA

BERNKOPF M.; “*Sterilisation of Bioresorbable Polymer Implants*”; Medical Device Technology, vol. 18, no. 3, May-June (2007).

CAPLAN Arnold I., (1991). Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Orthopaedic Research*. 9, pp.641 – 650.

DAS, Suman, et al. “*Freeform fabrication of Nylon-6 tissue engineering scaffolds*”. Rapid Prototyping Journal, 2003, vol. 9, no 1, p. 43-49.

GOODRIDGE R.D., TUCK C.J., HAGUE R.J.M.; “*Laser sintering of polyamides and other polymers*” en Progress in Materials Science 57 (2012) 229–267.

HAUGEN Håvard Jostein, MONJO Marta, RUBERT Marina, VERKET Anders, LYGSTADAAS Ståle Petter, ELLINGSEN Jan Eirik, RØNOLD Hans Jacob, W F h ; “*Porous ceramic titanium dioxide scaffolds promote bone formation in rabbit peri-implant cortical defect model*” en Acta Biomaterialia 9 (2013) 5390–5399.

HENAO Luis Eduardo, DUARTE Martha, AGREDA Jesus Alberto, GOMEZ Fernando, (2003). *Química Analítica II, Capítulo 4: Establecimiento de un Método Espectrofotométrico*. [En línea] Disponible en: http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ciencias/2001184/lecciones/Cap10/01_01_01.htm. [Último acceso: Abril 10, 2014]

HENNER KUHNE Jobst, BART Rainer, FRISCH Bertha, HAMME Claus, JANSSON Volkmar, ZIMMER Markus, (1994). Bone formation in coralline hydroxyapatite. *Acta Orthop Scand*. 65 (3), pp.246 – 252.

IP Wing Yuk, WANG Min, CHEUNG Wai Lam, ZHOU Wen You (2010). *Selective Laser Sintering of Poly(L- Lactide)/Carbonated Hydroxyapatite Nanocomposite Porous Scaffolds for Bone Tissue Engineering*, Tissue Engineering, Daniel Eberli (Ed.), ISBN: 978-953-307-079-7, InTech, Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/tissue-engineering/selective-laser-sintering-of-poly-l-lactide-carbonated-hydroxyapatite-nanocomposite-porous-scaffolds>.

KARAGEORGIU Vassilis, KAPLAN David, (2005). *Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. Biomaterials*. 26 (), pp.5474 – 5491.

LEE Mark H., ARCIDIACONO Judith A., BILEK Anastacia M., WILLE Jeremiah J., HAMILL Caitilin A., WONNACOTT Keith M., WELLS Martha A., OH Steven S., (2009). Considerations for Tissue-Engineered and Regenerative Medicine Product Development Prior to Clinical Trials in the United States. *TISSUE ENGINEERING*. Part B.

MADIGAN Nicolas N., MCMAHON B h , B Timothy, YASZEMSKIC Michael J., WINDEBANKA Anthony J.; “Current tissue engineering and novel therapeutic approaches to axonal regeneration following spinal cord injury using polymer scaffolds” y hy y & b y 169 9 183–199.

MILOVANOVIC Petar, POTOČNIK Jelena, DJONIC Danijela, NIKOLIC Slobodan, ZIVKOVIC Vladimir, DJURIC Marija, RAKOCEVIC Zlatko, (2012). Age-related deterioration in trabecular bone mechanical properties at material level: Nanoindentation study of the femoral neck in women by using AFM. *Experimental Gerontology*. 47, pp.154 – 159.

MIRANDA CHAVES NETTO Henrique Duque de; OLATE S ; F ;
9 ;
Internationa
Journal of Morphology. 27 (4), pp.1121 – 1127.

NARAYAN Roger, (2009). **Biomedical Materials**. 1st ed. University of North Carolina, Chapel Hill: Springer.

National Institutes of Health (2002). *Stem Cell Basics*. [ONLINE] Disponible en: <http://stemcells.nih.gov/info/basics/pages/basics1.aspx>. [Last Accessed Febrero 23 de 2012].

NAVIA MOROCHO Heidy Catalina, (2011). *TESIS: Evaluación in vitro del potencial citotóxico, genotóxico y efecto en el ciclo celular de extractos de tres especies de esponjas marinas del caribe colombiano*. 1st ed. Colombia: Universidad Nacional de Colombia sede Medellín; Facultad de ciencias; Escuela de Biociencias.

PABBRUWE Moreica B., KAFIENAH Wael, TARLTON John F., MISTRY Sanjay, FOX Dennis J., HOLLANDER Anthony P.; *“Repair of meniscal cartilage white zone tears using a stem cell/collagen-scaffold implant”* 31 1 583–2591.

PEREIRA T.F., SILVA M.A.C., OLIVEIRA M.F., MAIA I.A., SILVA J.V.L., COSTA F & É 1 : *“Effect of process parameters on the properties of selective laser sintered Poly(3-hydroxybutyrate) scaffolds for bone tissue engineering”*, Virtual and Physical Prototyping, 7:4, 275-285.

ROSS Michael H., PAWLINA Wojciech, (2007). *Histología, Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular*. 5th ed. Buenos Aires: Médica Panamericana.

SALDAÑA DÍAZ Andrés, (2010). *TESIS: Efecto de la Implantación de Células Mesenquimales de Tejido Adiposo Diferenciadas a Osteoblastos en la Reparación de Fémur en un Modelo Experimental Ovino*. León, España: Departamento de Medicina, Cirugía y Anatomía Veterinaria, Universidad de León.

SHACKELFORD James F., (2005). *Introducción a la Ciencia de Materiales para Ingenieros*. 6ta ed. Ribera de Loira, Madrid, España: Pearson Educación S.A.

TSONISA Panagiotis A., RIO-TSONIS Katia Del, (2004). Lens and retina regeneration: Transdifferentiation, stem cells and clinical applications. ***Experimental Eye Research***. 78 , pp.161–172.

V. RISBUD, Makarand; BHONDE, Ramesh R. *“Polyamide 6 composite membranes: Properties and in vitro biocompatibility evaluation”* Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2001, vol. 12, no 1, p. 125-136.

YEONG W.Y., SUDARMADJI N., YU H.Y., CHUA C.K., LEONG K.F., VENKATRAMAN S.S., BOEY Y.C.F., TAN L.P.; *“Porous polycaprolactone scaffold for cardiac tissue engineering fabricated by selective laser sintering”* en Acta Biomaterialia 6 (2010) 2028–2034.

ZHOU Wen You, LEE Siu Hang, WANG Min, CHEUNG Wai Lam, IP Wing Yuk; *“Selective laser sintering of porous tissue engineering scaffolds from poly(L-*

lactide)/carbonated hydroxyapatite nanocomposite microspheres” en J Mater Sci: Mater Med (2008) 19:2535–2540.